



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Masteroppgave 2016 60 stp
Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap og
Institutt for Mattrygghet og Infeksjonsbiologi

En QuEChERS metode for analyse av utvalgte legemidler i avløpsvann

A QuEChERS method for analysis of selected
pharmaceuticals in wastewater

Siri Havstein Aspnes
Kjemi

Forord

Denne masteroppgaven er skrevet ved Institutt for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (IKBM) og ved Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi (MatInf) ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU). Alt analytisk arbeid er utført ved Kjemilaboratoriet ved MatInf, og arbeidet med oppgaven har vært utført i perioden fra august 2015 til august 2016. Arbeidet med oppgaven har vært både spennende og utfordrende, og jeg har lært masse om metodeutvikling og analytiske prinsipper. Det har vært noen utfordringer underveis, blant annet problemer med instrumentet til bruk ved analysen. Med god hjelp fra de ansatte ved MatInf, løste dette seg etter hvert.

Jeg ønsker å takke alle som har hjulpet meg under arbeidet med denne oppgaven. Spesielt ønsker jeg å takke:

Veilederen min fra IKBM, Roland Kallenborn, for konstruktive tilbakemeldinger og hjelp gjennom skriveprosessen. Han satte meg i kontakt med MatInf, og ga meg muligheten til å arbeide med dette spennende temaet.

Min tilleggsveileder ved MatInf, Helene Thorsen Rønning, for all hjelp med metodevalideringsprosessen. Takker også for god hjelp med HPLC-MS/MSen da det oppsto problemer med denne, og for all hjelp og tilbakemeldinger under skriveprosessen. Jeg ønsker også å takke Tone Nordmann Asp, for all opplæring, hjelp og støtte under metodevalideringsprosessen. Videre vil jeg takke henne for arbeidet som tilleggsveileder frem til Helene overtok. I tillegg ønsker jeg å takke for støtte og forslag fra tilleggsveileder Jan Ludvig Lyche.

John A. Aasen Bunæs og Marit Spidsberg Paulsrud ved Algelaboratoriet ved MatInf, for at dere alltid slapp det dere hadde i hendene og hjalp meg når det oppsto problemer.

Erik Magnus Ræder for opplæring på HPLC-MS/MS, og for hjelp med optimalisering av HPLC-MS/MS-metoden for de utvalgte legemidlene.

Vestfjorden avløpsselskap (VEAS), for å ha gitt meg avløpsvannprøver, når enn jeg har hatt behov for dette. En spesiell takk til Rune Holmstad og Pia Ryrfors for å ha ordnet all logistikk, og til Trond Bergvatn for hjelp under prøvetakingen.

Oppgaven fikk økonomisk støtte fra: Flaggskip-programmet "Miljøgifter" ved FRAM - Nordområdesenter for klima- og miljøforskning, prosjekt "Transformation properties and environmental risk associated with pharmaceutical residues in the Arctic".

Oslo, august 2016

Siri Havstein Aspnes

Sammendrag

Legemiddelrester og produkter til personlig pleie, PPCP, samt deres metabolitter, har de senere årene gitt grunn til bekymring. Dette fordi disse stoffene er identifisert i blant annet avløpsvann, overflatevann og sedimenter, og de identifiserte nivåene har vist skadelig effekt på akvatiske organismer. En hovedvei for legemidler å nå det akvatiske miljøet, er via utløpsvann fra avløpsrensaneanlegg. Avløpsrensaneanlegg er opprinnelig ikke designet for eliminering av legemiddelrester. Det kreves omfattende overvåkningsmetoder for å kontrollere utslipp og fordelingsmønster i naturen. Oppgavens formål var å utvikle en analytisk metode basert på optimalisering av en «Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe» (QuEChERS) ekstraksjon for kvantitativ analyse av 15 utvalgte legemidler i avløpsvann.

Analysen ble utført med en høyoppløselig væskekromatograf koplet til et tandem massespektrometer (HPLC-MS/MS - Agilent Technologies, 1200 series/6460 QqQ). Fastfaseekstraksjon (SPE) med HLB-kolonner ble brukt for opprensning før QuEChERS ekstraksjonen, og for å oppkonsentrere vannprøvene fra 1 L prøve til et eluert sluttvolum på 10 mL. Før videre ekstraksjon ble det eluerte volumet dampet ned med trykkluft, for så å rekonstitueres i 5 mL grad 1 Milli-Q vann fra Millipore.

QuEChERS ekstraksjonen ble først optimalisert ved hjelp av rene standarder i Milli-Q vann, før arbeidet med avløpsvannmatriks startet. Parameterne som ble optimalisert var tørkesalt, buffermetode, ekstraksjonsmiddel, ekstraksjonstid og sentrifugeringstid og -hastighet. Videre ble det testet med varierende mengder PSA under dispersiv fastfaseekstraksjonen (dSPE), for å studere eventuelle interaksjoner mellom sorbenten og legemidlene. Det ble benyttet de parameterne som ga høyest sensitivitet for flest mulig forbindelser. Dette uten å påvirke responsen til et legemiddel i tydelig negativ retning.

Resultatene viste at tetrasyklin og ciprofloksacin kun kan ekstraheres når Na_2SO_4 benyttes som tørkesalt. Disse legemidlene vil ved bruk av MgSO_4 , saltet som benyttes i opprinnelig metode, danne komplekser med Mg^{2+} -ionene. Bufring av pH og tilsetning av Na_2EDTA for å hindre kompleksing av tetrasyklin og ciprofloksacin med metallioner, ga ingen fordeler. Dette verken under arbeidet med rene standardløsninger eller matriks. For å holde metoden så enkel som mulig, ble det valgt å gå videre med ubufret metode. Det var tilstrekkelig med en ristetid på 1 minutt ved tilsetning av de forskjellige komponentene for å oppnå en tilnærmet fullstendig ekstraksjon.

Sentrifugeringstid ble satt til 5 minutter, og sentrifugeringshastigheten til 1509 g ved ekstraksjonen, og 600 g ved dispersiv fastfase (dSPE)-steget.

Ekstraksjonsmetodens egnethet ble vurdert ut fra linearitet, presisjon og nøyaktighet for de 15 legemidlene i avløpsvann. Nøyaktigheten ble vurdert ut i fra tilsynelatende gjenfinning. Det ble satt krav til en R^2 -verdi $\geq 0,980$ og en RSD ≤ 15 % for å kunne anse lineariteten og presisjonen som god. Videre ble det satt krav til en nøyaktighet der avviket fra reell og estimert konsentrasjon i en prøve var ≤ 10 %. Metoden var å anse som godt egnet for kvantitativ analyse av ketoprofen, sulfametoksazol og trimetoprim i avløpsvann. Den var også godt egnet for den ene internstandarder sulfadoxin-D₃, vurdert ut fra resultatene til sulfadoxin. Lineariteten, presisjonen og nøyaktigheten var for nevnte legemidler over kravene som ble satt. Metoden viste likevel flere svakheter. De mest signifikante svakheterne var i forhold til den kromatografiske separasjonen, matrikseffekter, urenheter i standardene og andre interferenser som påvirket deteksjonen i matriks og rene standarder. Nevnte parametere må optimaliseres videre, for at metoden skal kunne regnes som egnet for ekstraksjon og kvantitativ analyse av alle de 15 legemidlene i avløpsvann. Flere forbedringstiltak er foreslått.

Abstract

Pharmaceuticals and personal care products, PPCP, and their metabolites, have in recent years been a reason of concern. These have been identified in wastewater, surface water and sediments, and the identified levels have shown adverse effects on aquatic organisms. As a main source for environmental PPCP contamination, sewage treatment plants (STPs) and wastewater were identified, draining pollutant effluents into the aquatic environment. Sewage and wastewater treatment plants (STP) are not designed for removal of anthropogenic pollutants. Therefore, for many PPCPs, no significant retention in the treatment process is reported. Comprehensive monitoring programs are required for controlling emissions and distribution patterns. The purpose of this study was to develop an analytical method based upon optimization of a reported Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) extraction for the quantitative analysis of 15 PPCPs in wastewater.

The analysis was performed with high performance liquid chromatography coupled to a tandem mass spectrometer (HPLC-MS/MS - Agilent Technologies, 1200 series/6460, QqQ). Solid phase extraction (SPE) utilizing HLB-columns was used for clean up before the QuEChERS extraction, and for volume reduction of the PPCP residues in the wastewater samples from an original volume of 1 L, to a final volume of 10 mL. The resulting eluate was evaporated under a constant stream of air, and dissolved in 5 mL type 1 Milli-Q water from Millipore, before further extraction.

The QuEChERS extraction was first optimized with pure standards in Milli-Q water, before starting with wastewater matrix. The parameters optimized was drying-salt and buffering agent, extraction solvent, extraction time, centrifugation time and -speed. The amount of PSA used in the dispersive solid phase extraction (dSPE) was varied, to investigate how the sorbent interacted with the different PPCPs. The parameters which gave the highest sensitivity for most of the PPCPS, without significantly decreasing the chromatographic performance of other PPCPs, was used.

The results clearly showed that it was necessary to use Na_2SO_4 as a drying salt, and not MgSO_4 as used in the original method, when extracting Tetracycline and Ciprofloxacin. Both pharmaceuticals have a capacity for complexation with metal-ions, in that case Mg^{2+} . Neither the results from standards in Milli-Q water, nor the results from wastewater matrix samples, indicated that buffering, or use of Na_2EDTA to prevent Tetracycline and Ciprofloxacin from chelating with metal-ions, gave an advantage. Therefore, to keep the method as simple as possible, it was chosen to use an

unbuffered approach. No further time for extraction was necessary apart from the 1 minute of shaking after addition of each component. The centrifugation time and speed was 1509 g for the extraction and 600 g for the dispersive solid phase extraction (dSPE), for 5 minutes.

Linearity, precision and accuracy, was used to evaluate the quality of the method, for the 15 different PPCPs in wastewater. Accuracy was evaluated from apparent recovery. To conclude with a satisfactory linearity, precision and accuracy the R^2 -value had to be $\geq 0,980$, the RSD ≤ 15 %, and the deviation for the calculated values in the control samples have to be ≤ 10 % from the true values. The method was considered as suitable for quantitative analysis of Ketoprofen, Sulfamethoxazole, and Trimethoprim in wastewater, as well as for one of the internal standards used, Sulfadoxin-D₃, evaluated from the results of Sulfadoxin. The method showed several weaknesses, the most significant in relation to the chromatographic separation, the matrix effects and the standard impurities and interferences that affected the detection of several of the PPCPs in wastewater matrix and in pure standards. These parameters must be optimized further before the method is considered suitable for extraction and quantitative analysis of the 15 PPCPs in wastewater. Ways to improve the method are suggested

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	III
Abstract.....	V
Figuroversikt.....	VIII
Tabelloversikt	IX
Forkortelser.....	XI
1 Innledning	1
1.1 Legemidler i det akvatiske miljø.....	1
1.2 Rensing av avløpsvann.....	3
1.3 Mål	6
1.3.1 Legemidler inkludert i metoden.....	7
2 Teori.....	11
2.1 Metodevalidering	11
2.2 QuEChERS	19
2.3 Fastfaseekstraksjon	21
2.4 Væskekromatografi.....	23
2.5 Massespektrometri	24
3 Eksperimentelt	27
3.1 Kjemikalier, gasser, løsninger og reagenser	27
3.2 Prøver	27
3.3 Tillaging av standarder.....	27
3.4 Optimalisering av massespektrometerparametere	29
3.5 Optimalisering av kromatografisk separasjon og ionekildeparametere	30
3.6 QuEChERS optimalisering	33
3.7 Neddampingstester.....	36
3.8 Metodetest i matriksprøver	37
3.8.1 Prøvetaking	37
3.8.2 Prøveopparbeiding.....	37
3.9 Metodevalidering	40
3.10 Avløpsvannprøver	42
4 Resultat og diskusjon.....	43
4.1 Metodeoptimalisering	43
4.1.1 Standardstabilitet	43
4.1.2 Optimalisering av massespektrometerparametere	44
4.1.3 Optimalisering av kromatografisk separasjon og ionekildeparametere.....	48
4.1.4 QuEChERS optimalisering.....	52
4.1.5 Neddampingstester	64
4.1.6 Metodetest i matriksprøver	65
4.2 Metodevalidering	69
4.3 Avløpsvannprøver	123
5 Konklusjon.....	129
6 Videre arbeid	131
Referanser.....	I
Vedlegg A.....	I

Figuroversikt

Figur 1-1 Flytskjema for renseprosessen for avløpsvann ved VEAS (VEAS 2016a).....	5
Figur 2-1 Definisjon for bestemmelsen av signal-støy forholdet i overenstemmelse med EN1948.	13
Figur 2-2 IUPAC sin definisjon av kvantifiseringsgrensen.....	14
Figur 2-3 Prosedyre for fastfaseekstraksjon med 4 trinn.....	21
Figur 2-4 Et generelt HPLC-system	23
Figur 3-1 Flytskjema for metoden som ble benyttet som et utgangspunkt under optimaliseringen av QuEChERS ekstraksjonen.....	34
Figur 3-2 Prøvepåføring på HLB-kolonnene via adaptore for stor-volum-SPE. Prøvene står høyere enn vakuu-manifolden.	38
Figur 4-1 Massespektra fra produksjonskann (PI) av ketoprofen med kollisjonsenergi 10 - 20 V. Forløperionet har m/z 255.	45
Figur 4-2 Kromatogrammet for de 15 legemidlene og sulfadoxin ved endelig HPLC-MS/MS metode.....	49
Figur 4-3 Flytskjema for SPE- opprensning og QuEChERS ekstraksjon av 15 ulike legemidler i avløpsvann.	68
Figur 4-4 Kalibreringskurve for S-prøvene til amlodipin sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	75
Figur 4-5 Kalibreringskurve for M-prøvene til amlodipin sine utvalgte ioner i avløpsvann.	76
Figur 4-6 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten for amlodipin sitt kvantifiseringsion, 238.1, med en M-prøve matriksblind.....	78
Figur 4-7 Kalibreringskurve for benzylpenicillin i avløpsvann	80
Figur 4-8 Kalibreringskurve for S-prøvene til ciprofloksacin sine utvalgte ioner i avløpsvann	83
Figur 4-9 Kalibreringskurve for M-prøvene til ciprofloksacin sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	83
Figur 4-10 Kromatogrammet fra ionesuppresjonstesten av ciprofloksacin med matriksblind M-prøve. Konfirmeringsionet 288.2 vises øverst, og kvantifiseringsion 314.2 nederst.	85
Figur 4-11 Kalibreringskurven for ibuprofen i avløpsvann. Legemiddelets areal er delt på internstandardens areal.	88
Figur 4-12 Kalibreringskurven for ibuprofen i avløpsvann.....	88
Figur 4-13 Kalibreringskurve for S-prøvene til ketoprofen sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	90
Figur 4-14 Kalibreringskurve for M-prøvene til ketoprofen sine utvalgte ioner i avløpsvann	91
Figur 4-15 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av ketoprofen sitt kvantifiseringsion 209 med matriksblind M-prøve.	92
Figur 4-16 Toppene for koffein i ren standard (venstre) og i utløpsvannmatriks (høyre).....	93
Figur 4-17 Kalibreringskurve til S-prøvene til losartan sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	95
Figur 4-18 Kalibreringskurven til M-prøvene til losartan sine utvalgte ioner i avløpsvann.	95
Figur 4-19 Kromatogrammet opparbeidet ved ionesuppresjonstest med losartan sitt kvantifiseringsion 207.2 mot matriksblind M-prøve	96
Figur 4-20 Toppene for metronidazol sitt kvantifiseringsion som ren standard (venstre) og i avløpsvann (høyre).	98
Figur 4-21 Toppene for kvantifiseringsionet til metoprolol i ren standard (venstre) og i utløpsvannmatriks (høyre).	99
Figur 4-22 Kalibreringskurven til S-prøvene til prednisolon sine utvalgte ioner i avløpsvann	101
Figur 4-23 Kalibreringskurven til M-prøvene til prednisolon sine utvalgte ioner i avløpsvann.	101
Figur 4-24 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av prednisolon sitt kvantifiseringsion 343.2 mot matriksblind M-prøve.....	103
Figur 4-25 Kalibreringskurven for S-prøvene til simvastatin sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	105
Figur 4-26 Kalibreringskurven for M-prøvene til simvastatin sine utvalgte ioner i avløpsvann. ...	105

Figur 4-27 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av simvastatin sitt kvantifiseringsion 285.2 mot matriksblind M-prøve.	106
Figur 4-28 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann når legemiddelets areal deles på internstandardens areal.	109
Figur 4-29 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	109
Figur 4-30 Kalibreringskurven for M-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann hvor legemiddelets areal er delt på internstandardens areal.	110
Figur 4-31 Kalibreringskurven for M-prøven til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann.	110
Figur 4-32 Kromatogrammet opparbeidet med en ionesuppresjonstest med matriksblind M-prøve for sulfadoxin sitt kvantifiseringsion 156.	112
Figur 4-33 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfametoksazol sine utvalgte ioner i avløpsvann	113
Figur 4-34 Kalibreringskurven for M-prøvene til sulfametoksazol sine utvalgte ioner i avløpsvann	114
Figur 4-35 Kromatogrammet opparbeidet ved ionesuppresjonstest av sulfametoksazol sitt kvantifiseringsion 156 med matriksblind M - prøve.	115
Figur 4-36 Toppene til tetrasyklin sine tre ioner i utløpsvannmatriks spiket til 600 ng/mL.	116
Figur 4-37 Kalibreringskurven for S-prøvene til trimetoprim sine utvalgte ioner i avløpsvann.....	118
Figur 4-38 Kalibreringskurven for M-prøvene til trimetoprim sine utvalgte ioner i avløpsvann. ..	118
Figur 4-39 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av trimetoprim sitt kvantifiseringsion 123.2 med matriksblind M-prøve.	120

Tabelloversikt

Tabell 2-1 F-kritisk verdi i et 95 % konfidensintervall. v_1 er satt til 1.	15
Tabell 3-1 Løsemiddel benyttet til stamløsninger på 1 mg/mL, og oppgitt holdbarhet på disse fra Kjemilaboratoriet.	28
Tabell 3-2 Gradienten benyttet som et utgangspunkt under metodeutviklingen, gitt av Cerqueira et al. (2014). Mobilfasegjennomstrømningshastigheten er 0,225 mL/min.	31
Tabell 3-3 Metoder testet for å se om HPLC-metoden kunne forkortes. Metode 1 har gjennomstrømningshastighet 0,225 mL/min. De andre har 0,450 mL/min.	31
Tabell 3-4 Sentrifugeringshastigheten omformet fra rpm til g for de to sentrifugene benyttet.	36
Tabell 4-1 Stabiliteten til stamløsning på 1 mg/mL og standardløsning på 10 μ g/mL for 9 legemidler over 1 måned ved 4,5 °C.	43
Tabell 4-2 Areal målt ved et produktionskann ved kollisjonsenergi 0 - 50 V for ketoprofen. Forløperionets har m/z 255.	44
Tabell 4-3 Arealet til ketoprofen sine to utvalgte produktion ved ulike kollisjonsenergier.	45
Tabell 4-4 Areal for ketoprofen to utvalgte produktion ved fragmentorspenning fra 50 - 190 V.	46
Tabell 4-5 Areal for ketoprofen sine utvalgte produktion ved fragmentorspenning fra 100 - 120 V og 120 - 140 V.	46
Tabell 4-6 Gradient for midlertidig metode under metodeutviklingen.	48
Tabell 4-7 De optimaliserte ionekildeparameterne. Ioniseringskilden var ESI (+).	50
Tabell 4-8 Gjennomsnittlig areal for Metoprolol en forenklet QuEChERS optimalisering. S prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE.	63
Tabell 4-9 Viktige faktorer som bidrar til metodeusikkerheten	121
Tabell 4-10 Estimert konsentrasjon i utløpsvannprøvene	127

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
GCB	Aktivt kull
CID	Kollisjonsindusert dissosiering
DMSO	Dimetylsulfoksid
dSPE	Dispersiv fastfaseekstraksjon (dispersive solid phase extraction)
Na ₂ EDTA	Etylendiamintetraeddiksyre-dinatriumsalt
EN	European Standard
eV	Elektronvolt
ESI	Elektrosprayionisering (electrospray ionization)
ESI (+)	Elektrosprayionisering med positiv polaritet
<i>g</i>	Gravitasjonskraft
²⁰¹ Hg	Tommer kvikksølv
HPLC	Høyoppløselig væskechromatografi (High performance liquid chromatography)
HPLC-MS/MS	Høyoppløselig væskechromatografi tandem massespektrometri
IS areal	Internstandardens areal
ISTD	Internstandard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Væskechromatografi (Liquid Chromatography)
LOD	Deteksjonsgrensen (Limit of Detection)
LOQ	Kvantifiseringsgrensen (Limit of Quantification)
M	mol/L
MatInf	Institutt for Mattrygghet og infeksjonsbiologi, NMBU
MeOH	Metanol, CH ₃ OH
mL/min	Milliliter per minutt
M-prøve	Delprøve tatt etter dSPE og forsuring med maursyre i QuEChERS ekstraksjonen
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massespektrometri
<i>m/z</i>	masse/ladning
<i>n</i>	Antall replikater
NMBU	Norges miljø- og biovitenskapelige universitet
Nr	Nummer
NSAIDs	Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (Non-steroidal anti-inflammatory drugs)
NVH	Norges veterinærhøgskole
p.a.	Pro analysi (løsemiddelkvalitet)
PAX	Aluminiumsklorider
pH	Potentia Hydrogenii
PI	Produktionskann
PIX	Jernklorider
PPCP	Legemiddelrester og produkter for personlig pleie (Pharmaceuticals and personal care products)
PSA	Primær sekundær amin (Primary secondary amine)

Psi	Pund per kvadrattomme (pound per square inch)
QqQ	Trippelkvadrupol
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe
R^T	Total gjenfinning
R^{MS}	Gjenfinning i MSen
R^{PO}	Gjenfinning i prøveopparbeidelsen
rpm	Omdreiningsfaktor (revolutions per minute)
RRHD	Rapid Resolution High Definition
RSD	Relativt standardavvik
RT	Retensjonstid
R^2	Korrelasjonskoeffisient
SD	Standardavvik
S/N	Signal/støy
SOP	Standard operation procedure
S-prøve	Delprøve tatt ut før dSPE i QuEChERS ekstraksjonen
SPE	Fastfaseekstraksjon (Solid phase extraction)
STD	Standardavvik
STP	Avløpsrensaneanlegg (Sewage treatment plant)
VEAS	Vestfjorden Avløpselskap
V/V	forhold: volum/volum

1 Innledning

1.1 Legemidler i det akvatiske miljø

Legemiddelrester og produkter til personlig pleie, PPCP, samt deres metabolitter og transformasjonsprodukter, har de senere årene gitt grunn til bekymring (Azzouz & Ballesteros 2013; Fatta-Kassinos *et al.* 2011; Fick *et al.* 2009; Huber *et al.* 2016; Kim *et al.* 2007; Tauxe-Wuersch *et al.* 2005; Vieno *et al.* 2007). Disse er blitt identifisert i blant annet avløpsvann, overflatevann og sedimenter. Videre viser de identifiserte nivåene av PPCP, at de kan gi skadelige effekter på akvatiske organismer (Fent *et al.* 2006; Salgado *et al.* 2012; Sun *et al.* 2016).

Flere studier indikerer at hovedveien for legemiddelrestene ut i det akvatiske systemet er via utløpsvann fra avløpsrenseanlegg (Fent *et al.* 2006; Huber *et al.* 2016; Kosma *et al.* 2010). Renseanlegg for kloakk er i utgangspunktet ikke designet for eliminering av legemiddelrester, men for å fjerne både fast og løst organisk materiale. Eliminering av legemidler fra avløpsvannet, skyldes hovedsakelig adsorpsjon til partikulært materiale, samt biodegradering under renseprosessen. Dette medfører at flere av legemidlene ikke elimineres fullstendig (Azzouz & Ballesteros 2013; Fent *et al.* 2006; Vieno *et al.* 2007). Det at mange legemidler ikke elimineres fullstendig i menneskekroppen, medfører at legemiddelet skilles ut som morforbindelse, metabolitter og polare konjugater (Gros *et al.* 2010). Sistnevnte vil kunne kløyves tilbake til morforbindelse under renseprosessen (Dai *et al.* 2014; Roberts *et al.* 2016).

Hvor stor grad av legemidlene som fjernes, avhenger av flere faktorer (Vieno *et al.* 2007). Både av deres fysisk-kjemiske egenskaper, samt hvilke mekanismer som benyttes under avløpsvannrensningen. Vieno *et al.* (2007) har også trukket frem faktorer som temperatur (Vieno *et al.* 2005), retensjonstid og fortynningsfaktor av kloakken (Kosma *et al.* 2010; Tauxe-Wuersch *et al.* 2005) som avgjørende for elimineringseffekten. Disse faktorene kan variere innenfor samme renseanlegg, og elimineringseffekten kan dermed variere for ett og samme renseanlegg og sesong (Vieno *et al.* 2007).

Utslippet medfører at legemiddelrestene kan komme i kontakt med organismer som ikke er det opprinnelige målet for legemiddelet. Da legemidlene er biologisk aktive, vil dette kunne påvirke organismene. Mange av legemidlene viser en uønsket økologisk effekt allerede ved

lave konsentrasjoner (Huber *et al.* 2016; Peysson & Vulliet 2013; Roberts *et al.* 2016). Kroniske effekter på grunn av tilførsel av lave konsentrasjoner av PPCP over tid, er enda ikke fullstendig studert. De fleste studiene har fokusert på eventuelle akutte effekter (Deblonde *et al.* 2011; Fent *et al.* 2006). Det kreves omfattende overvåkningsmetoder for å kontrollere utslipp og fordelingsmønster i naturen. Det bør også utføres ytterligere studier angående langtidseffekter av PPCP på akvatiske organismer.

1.2 Rensing av avløpsvann

Som nevnt i avsnitt 1.1 er avløpsvann en av de viktigste kildene for tilførsel av legemiddelrester i miljøet (Fent *et al.* 2006; Huber *et al.* 2016; Kosma *et al.* 2010). Elimineringseffekten av de ulike legemidlene i renseprosessen avhenger blant annet av de mekanismene som benyttes under renseprosessen. Under forsøket ble det hentet prøver fra Vestfjorden Avløpsselskap, VEAS. VEAS er Norges største renseanlegg, og mottar avløpsvann fra mer enn 600 000 innbyggere i Oslo, Bærum og Asker (VEAS 2016b).

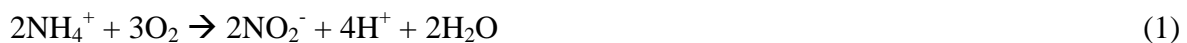
Renseprosessen for avløpsvann ved VEAS er illustrert i Figur 1-1 (VEAS 2016a). Avløpsvannet kommer til VEAS via en 40 km lang tunell (Ryrfors 2016). Vannet gjennomgår både mekanisk-, kjemisk- og biologisk rensing. Ved det første steget i den mekaniske rensingen passerer avløpsvannet en trapperist (Ryrfors 2016; VEAS 2016d). Trapperistene har en spalteåpning på 3 mm, og benyttes for å fjerne bomullspinner, plast og annet søppel. Etter at vannet har passert risten tilsettes fellingsmidler, henholdsvis jernklorider, PIX318, og aluminiumsklorider, PAX XL61 (Ryrfors 2016). Fellingsmidlene tilsettes som en del av den kjemiske rensingen. Avløpsvannet blir så ført videre til et luftet sandfang (Hval 2016). Tyngre partikler som sand og kaffebrut vil her sedimentere. Luftinnblåsing i sandfanget hjelper til i flokkuleringsprosessen med å slå sammen små partikler til større enheter. Dette medfører at partikler lettere partiklene sedimenterer til bunnen, og dermed kan fjernes som slam (VEAS 2016d).

Etter sandfanget, tilsettes en anionsk polymer. Denne, samt de tilsatte fellingsmidlene, medfører at fosfor og kolloidalt materiale danner fnokker. Fnokkene og partikulært materiale i avløpsvannet, vil skilles ut som slam i sedimenteringsbassenget (Hval 2016; Ryrfors 2016; VEAS 2016d). Bassenget består av korte, skråstilte lamellplater i vertikalstrømningsbasseng. Vannet flyter til toppen av bassenget, mens det partikulære materialet sedimenterer på bunnen. Mesteparten av fosforet, samt de delene av nitrogen og organisk materiale som er bundet til det partikulære materialet, vil følge med slammet (Sagberg *et al.* 1995; VEAS 2016c; VEAS 2016d). Da oppgaven fokuserer på avløpsvann, er ikke renseprosessen for slam beskrevet videre. Prosessen er imidlertid illustrert i Figur 1-1 (VEAS 2016a).

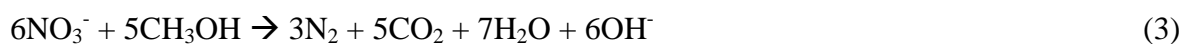
Det kjemisk rensede vannet skilles fra det sedimenterte slammet i sedimenteringsbassenget. Deretter føres det forbi en silplate, og videre til biologisk rensing (Ryrfors 2016). Det

biologiske rensetrinnet er en totrinnsprosess, med et nitrifikasjonstrinn og et denitrifikasjonstrinn. Ved VEAS benyttes spesielt utviklede Leca-kuler som bæremateriell for ulike bakterier og mikroorganismer under det biologiske rensetrinnet (Ryrfors 2016).

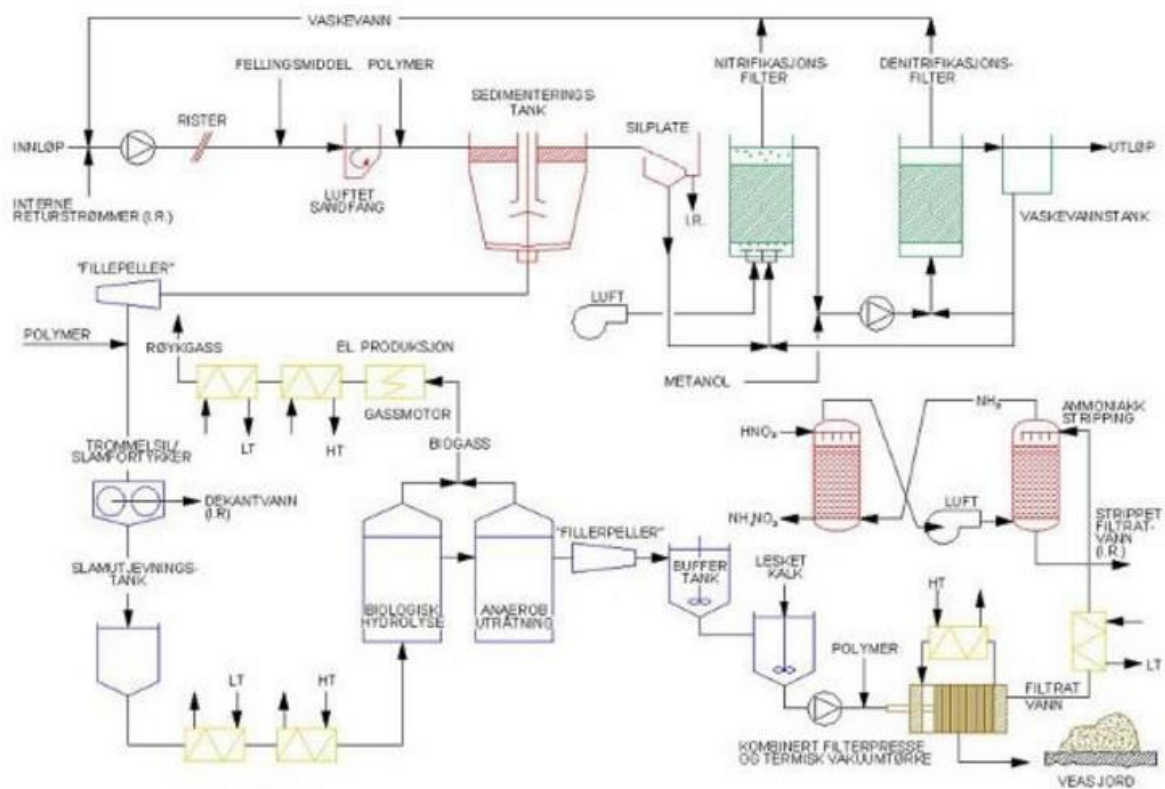
Først passerer vannet et basseng med et nitrifikasjonsfilter, bestående av 4 m med Leca-kuer (Ryrfors 2016; VEAS 2016a). Nitrifikasjonstrinnet er aerobt. Nederst på filteret finnes bakterier som fordøyer organiske stoffer som er oppløst i avløpsvannet. Bakterier som befinner seg lengre opp i filteret, fjerner ammonium via nitrifikasjon. Ammonium omdannes til nitritt, før det deretter omdannes til nitrat (VEAS 2016d). Dette er illustrert i likning 1 og 2, gitt av Helland (2008) og Vråle (1983). Oppholdstiden under nitrifikasjonstrinnet er på mindre enn 20 minutter (Ryrfors 2016).



Vannet vil videre passere et basseng med et denitrifikasjonsfilter bestående av 3 m med Leca-kuler (Ryrfors 2016). Her omdannes nitrat til nitrogen gass under anaerobe forhold. Denitrifikasjonsprosessen krever tilførsel av karbon, og her er det benyttet metanol (Hval 2016). Reaksjonen er gitt av Mohseni-Bandpi *et al.* (2013), se likning 3. Oppholdstiden under denitrifikasjonstrinnet er mindre enn 10 minutter (Ryrfors 2016).



I løpet av renseprosessen vil innholdet av nitrogen- og fosforforbindelser, samt partikulært materiale, minke kraftig. Etter denitrifikasjonsfilteret slippes det rensede avløpsvannet ut i Oslofjorden. Den totale oppholdstiden under vannbehandlingstrinnet er mindre enn 4 timer (Ryrfors 2016).



Figur 1-1 Flytskjema for renseprosessen for avløpsvann ved VEAS (VEAS 2016a).

1.3 Mål

Som tidligere nevnt har legemiddelrester og PPCP i naturen vært grunn til bekymring de senere årene (Azzouz & Ballesteros 2013; Fatta-Kassinou *et al.* 2011; Fick *et al.* 2009; Huber *et al.* 2016; Kim *et al.* 2007; Tauxe-Wuersch *et al.* 2005; Vieno *et al.* 2007). Dette fordi disse stoffene er identifisert i blant annet avløpsvann, overflatevann og sedimenter, og de identifiserte nivåene har vist skadelig effekt på akvatiske organismer (Fent *et al.* 2006; Salgado *et al.* 2012; Sun *et al.* 2016). Det er store variasjoner i legemidlene og deres metabolitter, og de tilhører flere ulike medikamentklasser. For å kunne overvåke forurensningen og hvilke negative effekter disse har på det akvatiske miljøet, vil det være fordelaktig å benytte en multimetode. En multimetode er en metode som benyttes for kvantitativ analyse av flere analytter med ulike egenskaper.

QuEChERS er en multimetode, opprinnelig utviklet for pesticidanalyse i frukt og grønnsaker (Anastassiades *et al.* 2003). QuEChERS metoden ble utviklet som en enkel, rask og billig multimetode for pesticidanalyse, der mange av stegene som ga flere mulige feilkilder, ble benyttet ut med mindre kritiske alternativ (CVUA Stuttgart 2011). Slike multimetoder har ofte svakheter i forhold til selektivitet, gjenfinning og andre analyseparametere sammenlignet med spesialiserte metoder for en forbindelse. Dette fordi legemidler tilhører ulike medikamentklassene og har ulike fysikalskjemiske egenskaper. Metoden vil derfor utarbeides til å være best mulig egnet for de aktuelle legemidlene (Zhang & Zhou 2007).

Oppgavens formål var å utvikle en analytisk metode basert på optimalisering av en QuEChERS ekstraksjon for kvantitativ analyse av 15 utvalgte legemidler innenfor ulike medikamentgrupper i avløpsvann. Her er en kort beskrivelse av legemidlene.

1.3.1 Legemidler inkludert i metoden

Alle de 15 utvalgte legemidlenes molekylformel, struktur og molekylvekt er gitt i Tabell A 1, Vedlegg A.

Antibiotika

Antibiotika er i henhold til Norsk helseinformatikk (2014) «et fellesnavn for legemidler som hemmer vekst eller dreper bakterier». I denne metoden skal flere typer antibiotika implementeres; ciprofloksacin, metronidazol, benzylpenicillin, sulfametoksazol, tetrasyklin og trimetoprim.

Benzylpenicillin

Benzylpenicillin, eller Penicillin G, er et smalspektret antibiotikum av typen β -laktamer, og benyttes til behandling av sykdom forårsaket av gram-positive bakterier (Dewick 2009). Penicillingruppen tilhører de eldste av de kliniske antibiotikaene, og benzylpenicillin var det første kommersielt tilgjengelige antibiotikum innenfor denne gruppen (Dewick 2009). Mennesket skiller ut mellom 60 - 90 % av legemiddelet uendret med urinen (Eadie & Tyrer 1980).

Ciprofloksacin

Ciprofloksacin er et bredspektret antibiotikum tilhørende fluorokinolonene under hovedgruppen kinoloner (Felleskatalogen 2015b; Zhang *et al.* 2001). Ciprofloksacin benyttes for å behandle ulike bakterieinfeksjoner, deriblant luftveisinfeksjoner, øre- og bihulebetennelser, urinveisinfeksjoner, ben og leddinfeksjoner og infeksjoner i hud og bløtvev (Felleskatalogen 2015b). Hovedandelen av legemiddelet som skilles ut er ren ciprofloksacin, henholdsvis 44.7 % i urinen og 25 % i faeces (New Zealand Datasheet 2012)

Metronidazol

Metronidazol er et antibiotikum tilhørende nitroimidazoler, og benyttes til behandling av ulike infeksjoner, blant annet bakteriell vaginose, anaerobe infeksjoner og for Crohns sykdom (Felleskatalogen 2014a). Metronidazol er et prodrug. Det vil si et legemiddel som i sin opprinnelige form ikke viser biologisk aktivitet, men som metaboliseres til en aktiv forbindelse (Brørs 2009; Sisson *et al.* 2002). 6 - 18 % av administrert dose skilles ut uendret i urinen (Norsk legemiddelhåndbok 2015b).

Tetrasyklin

Tetrasyklin er et bredspektret antibiotikum som benyttes for å behandle et vidt spekter med infeksjoner (Felleskatalogen 2015d). Tetrasyklin metaboliseres i liten grad i kroppen, og kun ca. 5 % metaboliseres til metabolitten Δ -epitetrasyklin (Agwuh & MacGowan 2006; Vojtova & Urbanek 2009). Som en følge av dette, skilles det ut høye konsentrasjoner av legemiddelet i biologisk aktiv form gjennom urin og faeces.

Trimetoprim

Trimetoprim er et syntetisk antibiotikum som benyttes for å bekjempe bakterieinfeksjoner, hovedsakelig i urinveiene (Foye et al. 2008; Gleckman et al. 1981). Legemiddelet benyttes ofte sammen med sulfametoksazol i et 1 til 5 forhold (Grung et al. 2007), og kan i tillegg brukes til behandling av luftveisinfeksjoner (Felleskatalogen 2015a). Hver for seg har de bakteriostatiske egenskaper, men når de benyttes sammen får de baktericidegenskaper (Norsk legemiddelhandbok 2013a). 50 % av legemiddelet skilles ut uforandret gjennom urinen og 5 % via faeces (Felleskatalogen 2016d; Norsk legemiddelhandbok 2015a).

Sulfametoksazol

Sulfametoksazol er et antibiotikum innen gruppen sulfonamider, og benyttes normalt sammen med trimetoprim. Ca. 25 % skilles ut gjennom urinen (Norsk legemiddelhandbok 2013a). Mer informasjon om legemiddelets bruksområde står under avsnittet om trimetoprim.

NSAIDs

NSAIDs, såkalte ikke-steroid anti-inflammatoriske legemidler, har som hensikt å hemme prostaglandinsyntesen. Dette fordi prostaglandinene normalt vil forårsake betennelses- og smertereaksjoner i kroppen (Dewick 2009). Videre har NSAIDs en febernedsettende effekt (Drugbank 2013; Norsk helseinformatikk 2013). 3 ulike NSAIDs (ketoprofen, ibuprofen og acetylsalisylsyre) skulle implementeres i metoden. Alle de tre legemidlene metaboliseres i stor grad hos menneske, og kun spormengder skilles ut uendret gjennom urinen (Cham *et al.* 1982; Norsk legemiddelhandbok 2016b; Norsk legemiddelhandbok 2016c).

Blodtrykksdempende legemidler

Metoprolol

Metoprolol er en fettløselig β 1-selektiv (kardioselektiv) reseptorantagonist (Norsk legemiddelhandbok 2015d) som benyttes til å behandle forstyrrelser i hjerterytmen, høyt blodtrykk og brystmerter. Videre benyttes det forebyggende ved migrene (Felleskatalogen 2016b). Legemiddelet metaboliseres i leveren, og ca. 5 - 10 % utskilles uendret gjennom urinen (Norsk legemiddelhandbok 2015d)

Amlodipin

Amlodipin tilhører medikamentklassen kalsiumantagonister (Felleskatalogen 2016c; Norsk legemiddelhandbok 2016a). Legemiddelet benyttes til å behandle høyt blodtrykk og hjertekramper (Felleskatalogen 2016c). Legemiddelet metaboliseres i stor grad, og kun ca. 10 % utskilles som morforbindelse gjennom urinen.

Losartan

Losartan tilhører medikamentgruppen angiotensin II reseptor antagonist, og benyttes til behandling av høyt blodtrykk (Felleskatalogen 2015c). Ca. 14 - 15 % av administrert losartan-dose omdannes til metabolitter av losartan. Disse er igjen mer potente enn morkomponenten (Norsk legemiddelhandbok 2015e). Omtrent 4 % av legemiddelet utskilles som uendret produkt gjennom urinen, og 6 % som legemiddelets aktive metabolitt (Felleskatalogen 2015c).

Statiner

Simvastatin

Simvastatin er et legemiddel i gruppen statiner (McKenney *et al.* 2009), og benyttes til behandling av koronarsykdom og høyt kolesterol. Videre er det effektivt ved hypertriglyseridemi (Felleskatalogen 2015e; McKenney *et al.* 2009; Norsk legemiddelhandbok 2013b).

Simvastatin er et prodrug, der legemiddelet eksiterer som et inaktivt lakton. Dette omdannes til en aktiv åpen syreform etter administrasjon (McKenney *et al.* 2009). Mellom 60 - 80 % av simvastatin adsorberes, mens mindre enn 5 % er biotilgjengelig. 13 % av legemiddelet skilles ut gjennom urinen og 58 % gjennom faeces (Antman 2012; McKenney *et al.* 2009).

Steroider

Prednisolon

Prednisolon er et glukokortikoid (Norsk legemiddelhåndbok 2015c) som benyttes til behandling av ulike betennelser og immunsykdommer. Eksempelvis benyttes legemiddelet til behandling av leddgikt, systemisk lupus og astma (Norsk helseinformatikk 2009; Xu *et al.* 2007). Ca. 20 % av prednisolondosen skilles ut uendret gjennom urinen (Norsk legemiddelhåndbok 2015c).

Stimulanter

Koffein

Koffein er en sentralnervestimulant, der hjernevirksomheten og åndedrettssenteret stimuleres. I tillegg reduseres nervernes reaksjonstid (Bjørneboe 2009) Koffein har også en vandrivende effekt. Videre benyttes den til behandling av visse typer hodepine, ofte i kombinasjon med bedøvende eller smertestillende midler (Felleskatalogen 2014b; Felleskatalogen 2016a).

Koffein finnes naturlig i flere typer drikker, deriblant kaffe og te. I tillegg er det tilsatt i ulike typer leskedrikker, eksempelvis Coca Cola. Mindre enn 5 % av koffeindosen skilles ut uendret gjennom urinen (Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research 2001; Magkos & Kavouras 2005).

2 Teori

2.1 Metodevalidering

Teorien om metodevalidering er basert på informasjon fra «Quality control in organic trace analysis» av Oehme (2007), og «H-KL 22». Førstnevnte er rettet mot sporanalyse av forurensninger i miljøet. «H-KL 22» er en SOP (standard operation procedure) som omhandler validering av analysemetoder for legemiddelanalyse. Dokumentet er utarbeidet ved Kjemilaboratoriet ved tidligere Norges veterinærhøgskole, NVH, Institutt for Mattrygghet og infeksjonsbiologi (MatInf) på Adamstuen i 2010. Norges veterinærhøgskole ble i 2014 en del av Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, NMBU. Under utarbeidelse av SOPen ble det tatt utgangspunkt i EU-direktiv 2002/657/EC (European Community 2002).

Det forutsettes et godt kvalitetssikringssystem, for at en metode skal kunne benyttes for kvantitativt eller kvalitativt å detektere en analytt i en prøve. Hensikten med kvalitetssikringssystemet er å tidlig kunne detektere og identifisere kilder til eventuelle instrumentfeil og andre feil ved metoden. For å kunne identifisere flere feil er det nødvendig med utfyllende kontrollkort. Disse vil fortelle når instrumentene ikke lenger gir tilfredsstillende resultater. Det er viktig med sporbarhet gjennom alle stegene i metoden, både når det gjelder hvilke standarder som er benyttet, samt vekt og temperatur.

For å detektere systematiske feil som oppstår på grunn av påvirkning fra matriksen, er det vanlig å benytte standardadddering til prøvematriks. Matrikseffekten avhenger ofte av analyttkonsentrasjonen (Ciminiello *et al.* 2006; Oehme 2007). Det er derfor viktig å sjekke metodens linearitet i matriks over hele måleområdet.

Videre er en validert analysemetode en viktig parameter for at en metode skal kunne benyttes. Validering av en analysemetode er av Kjemilaboratoriet NVH (2010) definert som «... at man ved praktisk utprøving kontrollerer at den fungerer etter hensikten». Under metodevalideringen skal flere analyseparametere vurderes for å kunne si noe om metodens analytiske yteevne. Dette gjelder blant annet metodens robusthet, nøyaktighet, presisjon, reproduserbarhet, sensitivitet, selektivitet, gjenfinning, linearitet, måleusikkerhet og måleområdet.

Måleusikkerhet

Metodens måleusikkerhet beskriver «... variasjonen i metodens kvantifiseringsresultater» (Kjemilaboratoriet NVH 2010). Måleusikkerheten kan bestemmes ved regelmessig å utføre kontrollanalyser, der resultatene kontrolleres mot et kontrollkort.

Selektivitet

En selektiv analysemetode er en metode der både prøvetakingen og ekstraksjonen utføres på en slik måte at analytten bevares i størst mulig grad. Dette samtidig som uønskede og forstyrrende komponenter fjernes. Etter ekstraksjonen vil en selektiv analysemetode avsluttes med en selektiv deteksjon av analytten. Under forsøket ble MRM benyttet. Den første kvadrupolen i MSen selekterte for forløperionet, og den andre for produktionet, se avsnitt 2.5. Dette gir en mer selektiv deteksjonsmetode, da kun forbindelser med samme ioneoverganger som analytten detekteres. Ved bruk av MRM-analyser, der analyttens topp står alene uten noe nærliggende topper av betydning, samtidig som løsemiddelet er fritt for analyttoppen, regnes deteksjonsmetoden som selektiv for analytten.

Sensitivitet

En metodes sensitivitet beskriver dens evne til å detektere endringer i konsentrasjonen til en analytt. Dette reflekteres i stigningstallet til den lineære regresjonslinjen, der et høyere stigningstall indikerer en bedre sensitivitet. Videre forteller et høyere stigningstall at en liten endring i konsentrasjonen vil gi stor endring i respons.

Robusthet

Metodens robusthet er av Oehme (2007) definert som «den ikke-signifikante responsen en analytisk metode har til små endringer i metodeparameterne» (oversatt). Robustheten forteller noe om hvor sensitiv metoden er for ytre fysiske og kjemiske forandringer, slik som temperatur og pH.

Identifikasjonskriterier

For å identifisere analytten må flere kriterier være oppfylt. Ved trippelkvadrupolanalyse vil to eller flere produktioner kunne benyttes. Det er vanlig å benytte ett produktion til kvantifisering og ett for konfirmering. Analytten kan identifiseres ved å se på den relative ioneintensiteten mellom analyttens kvantifiseringsion og konfirmeringsion.

I EU-direktiv 2002/657/EC (European Community 2002) er det satt krav til den relative ioneintensiteten. Variasjonen mellom ionene må ikke overstige

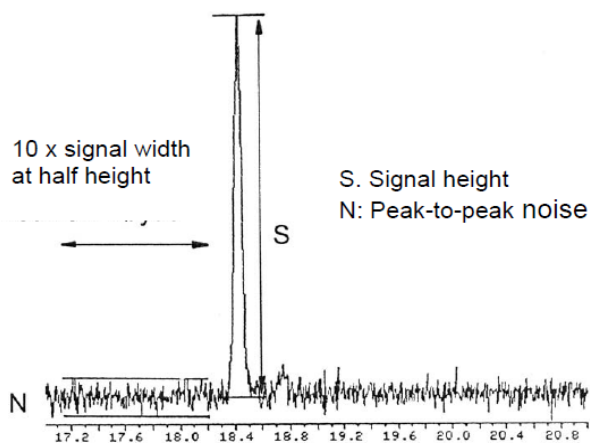
- 20 % om den relative intensiteten er over 0,5
- 25 % om den er mellom 0,2 - 0,5
- 30 % om den er mellom 0,1 - 0,2
- 50 % om den er mindre eller lik 0,1.

Et annet identifikasjonskrav er den relative retensjonstiden. Dette forteller om analyttens retensjonstid i forhold til internstandardens retensjonstid. EU-direktiv 2002/657/EC setter i tillegg krav til at den relative retensjonstiden må ha en RSD mindre enn 2,5 %.

Måleområde

Metodens måleområde sier noe om hvilke konsentrasjonsområder kvantifisering av analytten kan utføres i, med definert nøyaktighet og presisjon. Ofte spenner dette området seg fra analyttens kvantifiseringsgrense, LOQ, til den øvre standarden i linearitetsrekken. Dette forutsetter et lineært forhold mellom konsentrasjon og respons. For krav til linearitet, se eget avsnitt.

LOD, deteksjonsgrensen, sier noe om hvilken konsentrasjon analytten kvalitativt kan identifiseres i prøven med en gitt sikkerhet. LOD kan defineres på flere måter. En av definisjonene er $3 \cdot \text{signal/støy}$ forholdet, ved $10 \cdot \text{signalbredden}$ ved halvhøyde. Signal/støyforholdet forkortes videre S/N. Definisjonen for bestemmelse av signal/støyforholdet er i overensstemmelse med EN1948 er gitt av Oehme (2007). Dette er illustrert i Figur 2-1.



Figur 2-1 Definisjon for bestemmelsen av signal-støy forholdet i overensstemmelse med EN1948.

LOQ gir informasjon om fra hvilken konsentrasjon analytten kan kvantifiseres med en gitt sikkerhet i prøven. Som LOD kan LOQ bestemmes som $10 * S/N$ ved $10 * \text{signalbredden}$ ved halvhøyde.

IUPAC definerer LOQ etter formelen gitt i Figur 2-2 (IUPAC 1997; Oehme 2007).

$$c_L = c_B + k s_B$$

- c_B : Average of method blank
- s_B : Standard deviation of method blank
- k: Factor to be defined

Figur 2-2 IUPAC sin definisjon av kvantifiseringsgrensen.

Det er vanlig å benytte 3 som k for LOD, og 10 som k for LOQ (Gjengedal 2014), på samme måte som definisjonen der S/N forholdet benyttes.

Linearitet

Metodens lineære område er i H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010) definert som «området metoden produserer et signal som er proporsjonalt med konsentrasjonen». Flere kriterier skal være oppfylt. I H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010) settes det krav til at linearitetsrekken opparbeidet med minimum 5 målepunkter skal ha en R^2 -verdi på $> 0,99$. Videre kreves det et maksimalt avvik på måleområdet på $\leq 5\%$. Det er også satt et krav til at 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet med Y-aksen skal inkludere verdien 0. En responsfaktortest utføres ved å dele analyttens respons på internstandardens respons, for så og dele denne faktoren på analyttens konsentrasjon. I H-KL 22 gis det et ønske om en RSD på $< 15\%$ for responsfaktortesten. Responsfaktortesten må ikke forveksles med responsfaktoren beskrevet under nøyaktighet og gjenfinning.

Som tidligere nevnt i avsnitt 1.3, er QuEChERS en multimetode, der metoden utarbeides til å være best mulig egnet for de aktuelle legemidlene. Derfor settes det lavere krav til linearitet og presisjon, enn hva som ville ha blitt godtatt ved en mer spesifikk analyse. I denne oppgaven godtas en R^2 -verdi på $\geq 0,980$.

En F-test beskriver det observerte forholdet mellom en avhengig og en uavhengig variabel, og om dette forekommer tilfeldig (Miller & Miller 2010). I dette forsøket var de nevnte variablene konsentrasjon og respons. Dersom den observerte F-verdien er større enn F-kritisk

verdi, kan det konkluderes med at forholdet mellom de to variablene er signifikant. I et 95 % konfidensintervall hvor v_1 er satt til 1, er F-kritisk verdi gitt i Tabell 2-1 (Miller & Miller 2010). v_1 verdien er beregnet etter formelen i likning 4. Likningen er hentet fra Microsoft office (2016).

$$v_1 = n - df - 1 \quad (4)$$

n står for antall datapunkter og df står for frihetsgrader (Microsoft office 2016).

Tabell 2-1 F-kritisk verdi i et 95 % konfidensintervall. v_1 er satt til 1.

Frihetsgrader	F-kritisk verdi
2	18,51
3	10,13
4	7,71

Presisjon

Metodens presisjon beskriver «overensstemmelsen i analyseresultatene mellom repeterte analyser av samme prøve» (Kjemilaboratoriet NVH 2010). Dette er et mål på tilfeldige feil i metoden. Presisjonen i metoden beskrives her ut i fra prøveparalleller, og ikke ut i fra repeterte målinger av samme prøve. Det må under metodevalideringen settes krav til maksimalt tillatt avvik. Dette beregnes ofte som standardavvik, SD, eller relativt standardavvik, RSD.

Nøyaktighet

Metodens nøyaktighet beskriver hvordan analyseresultatet samsvarer med reell verdi, og denne kan benyttes som et mål på systematiske feil i metoden. Nøyaktigheten defineres ut i fra metodens riktighet og metodens presisjon. Metodens riktighet kan bestemmes ved hjelp av et sertifisert referansemateriale. Alternativt kan dette bestemmes ved å studere tilsynelatende gjenfinning, der flere matriksblind er spiket til et gitt nivå. På grunn av manglende sertifisert referansemateriale, og med tilgang til flere sertifiserte standarder, ble det benyttet sistnevnte metode under metodevalideringen. Avviket fra sannverdi estimeres ved formelen gitt i likning 5, der C står for konsentrasjon.

$$\text{Avviket fra sann verdi (\%)} = \frac{C_{\text{målt}} - C_{\text{sann}}}{C_{\text{sann}}} * 100 \quad (5)$$

Konsentrasjonen i en ukjent prøve kan estimeres på flere ulike måter, både ved hjelp av den lineære regresjonslinjen, og ved hjelp av responsfaktoren mellom analytt og internstandard.

Responsfaktoren bestemmes etter formelen gitt av Oehme (2007), se likning 6.

$$f_i = \frac{\text{Konsentrasjon } P_i * A_{S(ISTD)}}{\text{Konsentrasjon } ISTD * A_{S(i)}} \quad (6)$$

f_i står her for responsfaktoren til analytten P_i relativ til internstandarden, $A_{S(i)}$ står for signalareal til analytt P_i og $A_{S(ISTD)}$ står for signalarealet til internstandarden.

Responsfaktoren kan videre benyttes til å beregne analyttens konsentrasjon i ukjent prøve etter formelen gitt av Oehme (2007), se likning 7.

$$M_i = \frac{\text{Mengden } ISTD * A_{P(i)} * f_i}{A_{P(ISTD)}} \quad (7)$$

M_i står her for analyttkonsentrasjonen, $A_{P(i)}$ står for signalarealet til analytt P_i og $A_{P(ISTD)}$ for signalarealet til internstandarden.

En fordel med å bruke en internstandard under kvantifiseringen, er at fordampning av løsemiddel under opparbeidningen er av mindre betydning. Dette fordi det kun er forholdet mellom internstandard og analytt som er viktig. Det forutsettes likevel at internstandarden tilsettes med en presisjon på 1 % (Oehme 2007). Ved å tilsette internstandarden ved ulike steg i metoden, kan de stegene der analytten tapes kunne detekteres.

Det settes flere krav til internstandarden for at den skal kunne benyttes på en slik måte som nevnt ovenfor. Det er ønskelig at analytten og internstandarden har så like strukturer og fysikalsk-kjemiske egenskaper som mulig. Dette for at de skal påvirkes likt gjennom prøveoppbeidelsen. Isotopmerkede analytter er ideelle som internstandarder, men stereoisomere og homologe forbindelser kan være gode alternativer. Videre bør internstandarden og analytten eluere ut i samme tidsrom, der retensjonsforskjellen bør være mindre enn 30 % (Oehme 2007). Internstandarden kan ikke være tilstede i prøven fra før av.

Gjenfinning

Under metodevalideringen er både total gjenfinning, gjenfinning på MSen og gjenfinning i prøveopparbeidelsen parametere som må vurderes.

Total gjenfinning, R^T , beskriver «analytt i prøven som detekteres med analysemetoden. Dette inkluderer både tap under prøveopparbeidelsen og påvirkning av matrikseffekter» (Kjemilaboratoriet NVH 2010). R^T beregnes her etter formelen gitt av Kjemilaboratoriet NVH (2010), se likning 8. Spiket prøve vil si prøve spiket før selve prøveopparbeidelsen finner sted.

$$R^T (\%) = \frac{\text{signal spiket prøve} - \text{signal matriksblind}}{\text{signal ren standard}} * 100 \% \quad (8)$$

Gjenfinning på MSen, R^{MS} , er et mål på matrikseffekten i HPLC-MS/MSen. R^{MS} bestemmes ved å måle en matriksblind spiket rett før HPLC-MS/MS-analyse, og beregnes etter formelen gitt av Kjemilaboratoriet NVH (2010), se likning 9.

$$R^{MS} (\%) = \frac{\text{signal spiket matriksblind} - \text{signal matriksblind}}{\text{signal ren standard}} * 100 \% \quad (9)$$

Gjenfinning i prøveopparbeidelsen, R^{PO} , bestemmes etter formelen gitt av Kjemilaboratoriet NVH (2010), se likning 10.

$$R^{PO} (\%) = \frac{\text{signal spiket prøve} - \text{signal matriksblind}}{\text{signal spiket matriksblind}} \quad (10)$$

Matrikseffekten kan også studeres ved hjelp av en ionesuppresjonstest. Dette utføres ved at matriksblindprøven injiseres samtidig som analytten kontinuerlig innføres på MSen ved bruk av en T-kobling. En økning i signal i kromatogrammet, eller en R^{MS} over 100 %, indikerer en positiv matrikseffekt (signaløkning). En nedgang i signalet i kromatogrammet, eller en R^{MS} under 100 %, indikerer en negativ matrikseffekt (ionesuppresjon).

Gjenfinningen av internstandard kan benyttes som et kvalitetskriterium i kvalitetssikringssystemet for hver enkelt prøve. Gjenfinningen beregnes ved hjelp av en responsfaktor, som beregnes etter formelen gitt av Oehme (2007), se likning 11.

$$f_r = \frac{\text{Konsentrajson ISTD} * A_{S(RSTD)}}{\text{Konsentrasjon RSTD} * A_{S(ISTD)}} \quad (11)$$

f_r står for responsfaktoren til internstandarden relativ til gjenfinningsstandarden, og $A_{S(RSTD)}$ står for signalarealet til gjenfinningsstandarden. Gjenfinningsstandarden er en standard tilsatt prøven rett før deteksjon på HPLC-MS/MS.

Ved hjelp av responsfaktoren kan gjenfinningen av internstandarden beregnes etter formelen gitt av Oehme (2007), se likning 12.

$$\text{Gjenfinning (\%)} = \frac{\text{Addert mengde RSTD} * A_{P(ISTD)} * f_i * 100}{\text{Addert mengde ISTD} * A_{P(RSTD)}} \quad (12)$$

$A_{P(RSTD)}$ står her for signalet til gjenfinningsstandarden i prøven.

2.2 QuEChERS

QuEChERS, forkortelse for «Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe», er en prøveopparbeidelsesmetode utviklet tidlig på 2000-tallet (Anastassiades *et al.* 2003; Anastassiades *et al.* 2007). En optimalisert metode for analyse av 229 pesticider ble publisert i 2005 (Lehotay *et al.* 2005a). Metoden ble opprinnelig benyttet til pesticidanalyse i frukt og grønnsaker. I ettertid er den blitt benyttet i flere ulike matrikser (Cerqueira *et al.* 2014), eksempelvis ris (Koesukwiwat *et al.* 2008; Nguyen *et al.* 2007), korn og mel (Kolberg *et al.* 2011; Mastovska *et al.* 2009), barnemat (Aguilera-Luiz *et al.* 2012) og fiskekjøtt (Lazartigues *et al.* 2011; Lopes *et al.* 2012), samt til legemiddelanalyse i jord og kloakkslam (Bragança *et al.* 2012; Peysson & Vulliet 2013)

I QuEChERS metoden ekstraheres et homogenisert vandig prøvemateriale i en en-fase separasjon med like mengder acetonitril, ACN (Anastassiades *et al.* 2003). Hvis vanninnholdet i prøvematerialet ikke er tilstrekkelig, må vann tilsettes (Anastassiades *et al.* 2007). Videre tilsettes magnesiumsulfat ($MgSO_4$) og natriumklorid (NaCl) for å initiere en væske-væske fordeling. $MgSO_4$ fungerer som et tørkesalt, der bindingen av vann i vannfasen fremmer fordeling av analyttene inn i den organiske fasen (Anastassiades *et al.* 2003). NaCl fremmer også fase-separasjonen, der økende mengder NaCl fører til en minkende mengde vann i ACN-fasen. Dette gjør den organiske fasen mindre mottakelig for polare analytter (Anastassiades *et al.* 2003).

Den opprinnelige QuEChERS metoden av Anastassiades *et al.* (2003) involverer ingen buffersalter for pH-justering. Senere kom to bufrede varianter: AOAC 2007.01 (Lehotay *et al.* 2005b) og European method EN 15662 (Anastassiades *et al.* 2007; BRITISH STANDARD 2008). Førstnevnte metode benytter natriumacetat ($C_2H_3NaO_2$, forkortet NaOAc), samt ACN forsuret med 1 % V/V eddiksyre. NaCl benyttes ikke. Dette gir en pH på >5 i vannfasen, og <4 i ACN-fasen (Lehotay *et al.* 2005b). Sistnevnte metode benytter trinatriumcitrat dihydrat ($Na_3-Cit-2H_2O$), og dinatrium hydrogencitrat sesquihydrat ($Na_2Cit-1.5H_2O$). Bufringen gir da en pH mellom 5 - 5,5 (Anastassiades *et al.* 2007; Stevens 2010).

Etter tilsetning av saltene, utføres en sentrifugering. Det dannes to separate faser. Pesticidene eller legemidlene skal nå befinne seg i den organiske fasen (Anastassiades *et al.* 2003; CVUA Stuttgart 2011). Ved veldig polare forbindelser, kan metanol (CH_3OH , forkortet MeOH),

tilsettes for å hjelpe ekstraksjonen av disse forbindelsene over i den organiske fasen (Stevens 2010).

En delprøve av den organiske fasen overføres deretter til et dSPE-rør som inneholder $MgSO_4$ og en sorbent. Dette trinnet brukes til å fjerne overflødig vann, samt ulike matrikskomponenter som ko-ekstraherer (Anastassiades *et al.* 2003). Ved både ubufret metode og AOAC metoden benyttes primær sekundær amin, PSA som sorbent. Det benyttes ulike sorbenter for opprensning ved EN-metoden, avhengig av typen prøve som opparbeides (Anastassiades *et al.* 2003; Lehotay *et al.* 2005b). For de fleste prøvene benyttes PSA som sorbent. PSA strukturen er illustrert i Figur A 1, Vedlegg A. PSA benyttes da sammen med $MgSO_4$, og den fjerner fettsyrer og andre organiske syrer samt noe sukker og pigmenter (Anastassiades *et al.* 2003; Anastassiades *et al.* 2007). Dersom prøven inneholder klorofyll eller karotenoider, kan aktivt kull, GCB, benyttes i tillegg til PSA. Dersom prøvene inneholdende mer enn 50 mg fett, anbefales det å tilsette C_{18} -sorbent i tillegg til PSA (Anastassiades *et al.* 2007).

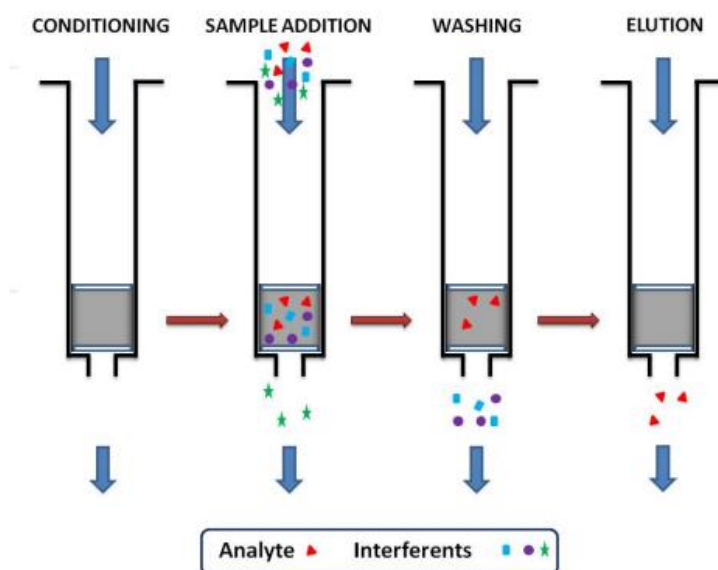
Utfrysning er en annen metode som benyttes til fjerning av lipider, voks, sukker og andre matrikskomponenter med en lav løselighet i ACN. Stoffene vil felles ut, og kan deretter fjernes ved dekantering, sentrifugering eller filtrering av kaldt ekstrakt. Deretter foretas en dSPE-ekstraksjon (Anastassiades *et al.* 2007).

Ved analyser av analytter med syregrupper, kan disse interagere med aminosorbenter, slik som PSA (Anastassiades *et al.* 2007). Disse må derfor analyseres direkte fra råekstraktet etter sentrifugering, før dSPE-ekstraksjonen kan utføres.

Etter sentrifugeringstrinnet fås et sluttekstrakt, som er klart for analyse. Ved reaksjon med PSA vil pH i sluttekstraktet normalt være mellom 8 og 9, noe som er uheldig for base-sensitive analytter (Anastassiades *et al.* 2007). For å justere pH-en, tilsettes $10\mu L/mL$ 5 % V/V maursyre i ACN. For syre-sensitive analytter kan denne forsuringen være uheldig, og disse bør derfor analyseres fra et ikke-forsuret ekstrakt.

2.3 Fastfaseekstraksjon

Fastfaseekstraksjon, SPE, baserer seg på hvordan en analytt fordeler seg mellom fast stasjonær fase og væskefase (Lucci *et al.* 2012; Simpson & Wells 2000). Analytten binder reversibelt med den stasjonære fasen, og vil deretter kunne eluere ved bruk av et egnet elueringsmiddel. Teknikken benyttes til flere formål. Den kan både benyttes til å oppkonsentrere prøver, slik at konsentrasjonen i prøven blir høy nok for deteksjon med ulike analyseteknikker, og til å fjerne interfererende matrikskomponenter fra prøvematerialet. SPE baserer seg hovedsakelig på 4 ulike steg; kondisjonering, prøvepåsetting, vasking og eluering. Disse stegene er illustrert i Figur 2-3, gitt av Lucci *et al.* (2012).



Figur 2-3 Prosedyre for fastfaseekstraksjon med 4 trinn.

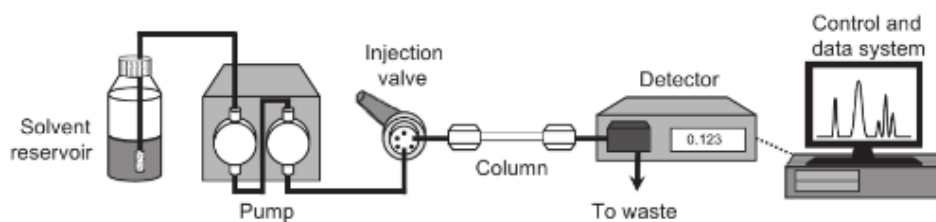
Under kondisjoneringssteget tilsettes kolonnen et løsemiddel. Hvilket løsemiddel som benyttes avhenger av sorbenten. Løsemiddelet vil interagere med de funksjonelle gruppene på sorbenten, og aktiverer dem slik at de er i stand til å interagere med prøvematriksen (Lucci *et al.* 2012). Prøven påføres så SPE-kolonnen. Både analytten og noen av matrikskomponentene vil adsorbere til stasjonærfasen, mens resten av prøven føres videre gjennom kolonnen. Analytten kan deretter skilles fra matrikskomponentene gjennom et vaskesteg. Da påføres et løsemiddel som er sterkt nok til å eluere ut interferensene, men ikke analytten. I de tilfellene der matrikskomponenter interagerer sterkere med SPE-sorbenten enn analyttene, kan det benyttes et løsemiddel som er sterkt nok til å eluere ut analytten, men ikke interferensene benyttes (Lucci *et al.* 2012; Simpson & Wells 2000). De ulike komponentene i prøven vil

eluere ut fra SPE-kolonnen når interaksjonen med væskefasen er sterkere enn interaksjonen med den stasjonære fasen (Simpson & Wells 2000).

Hvilke sorbenter som benyttes ved SPE avhenger av de kjemiske egenskapene til analytten, og mulige interaksjoner mellom analytten og de funksjonelle gruppene på sorbentoverflaten (Lucci *et al.* 2012). Under dette arbeidet ble det benyttet HLB-kolonner fra Oasis. HLB-sorbenten består av to monomerer, den lipofile divinylbenzen og den hydrofile N-vinylpyrrolidone (Fontanals *et al.* 2007; Lucci *et al.* 2012). Den lipofile monomeren gjør at sorbenten har omvendtfase egenskaper, og den hydrofile polymeren gjør at sorbenten har en økt retensjon for polare komponenter (Waters Corporation 1998).

2.4 Væskekromatografi

Kromatografi baserer seg på separasjon, der forbindelsene som skal separeres fordeles mellom en stasjonær fase og en mobilfase (Poole 2003). Da de forbindelsene som separeres interagerer i ulik grad med den stasjonære- og mobile fasen, vil disse eluere ut av det kromatografiske systemet på ulike tidspunkt. I væskekromatografi er den mobile fasen en eller flere væsker. Den mobile fasen kan i tillegg være en gass, og separasjonsteknikken kalles da gasskromatografi (Poole 2003). Høyoppløselig væskekromatografi (HPLC) er av Weston og Brown (1997) beskrevet som «væskekromatografi der den mobile væskefasen mekanisk pumpes gjennom en kolonne pakket med den stasjonære fasen» (oversatt). De ulike væskene i systemet kan enten påføres isokratisk eller i en gradient. Et HPLC system inneholder et eller flere mobilfasereservoar, pumpe som trekker mobilfasene, en injektor som injiserer prøven, en kolonne der komponentene i prøven separeres samt en detektor. De ulike delene i et HPLC-system er illustrert i Figur 2-4 gitt av Shackman (2013).



Figur 2-4 Et generelt HPLC-system

Egenskapene til både den stasjonære- og den mobile fasen kan varieres. Når den mobile fasen i HPLC-systemet er upolar, og den stasjonære fasen er polar kalles dette normalfasekromatografi. Dette er omvendt ved omvendtfasekromatografi, der den mobile fasen i HPLC-systemet er mer polar enn den stasjonære fasen (Poole 2003; Weston & Brown 1997).

2.5 Massespektrometri

Teorien om massespektrometri er basert på informasjon fra «Mass spectrometry: principles and applications, 3ed.» av Hoffmann og Stroobant (2007).

Det kan benyttes flere detektorer til deteksjon av de separerte forbindelsene fra kolonnen i HPLC-systemet. Under dette arbeidet ble det benyttet et massespektrometer (MS). En MS separerer analyttene avhengig av dets masse over ladning, m/z .

Før prøven kan separeres i massespektrometeret, må den ioniseres. Prøven kan kun ioniseres når den er i gassform. Det er derfor behov for en kobling mellom HPLC-kolonnen og massespektrometeret, der prøven går fra væskefase til gassfase. Flere ulike metoder kan benyttes til dette formålet, deriblant termospray ionisering, elektropray ionisering og atmosfærisk trykk kjemisk ionisering.

Ved elektropray ionisering, ESI, påføres et sterkt elektrisk felt til en væskefase, samtidig som væskefasen beveger seg gjennom et kapillærrør. Dette fører til at ladningen samles på væskens overflate ved enden av kapillæret. På grunn av den høye ladningen, blir det dannet en spray bestående av dråper med høy ladning. En nebulizergass påføres i samme retning som kapillæret. Denne vil hjelpe til med spraydannelsen (Banerjee & Mazumdar 2012; Ho *et al.* 2003). For å dampe vekk løsemiddelet, kan de ladde dråpene føres gjennom en oppvarmet inert gass. Den vanligste gassen som benyttes er nitrogen.

Ved løsemiddelfordampningen dannes det mindre og mindre dråper, og prøven vil til slutt gå over i gassfase. Reaksjonen forekommer under atmosfærisk trykk. De ladde ionene føres videre inn til en masseanalysator, der de så separeres. Deretter detekteres de av en detektor. ESI kan utføres både med positiv og negativ polaritet. Ved positiv polaritet forekommer det en overføring av et proton eller andre positive ioner til analytten, mens det ved negativ polaritet mistes et proton.

Det kan benyttes flere ulike masseanalysatorer, og i denne oppgaven ble det benyttet en trippelkvadrupol, QqQ. En kvadrupol består av 4 sirkulære eller hyperbolske staver, to og to plassert parallelt ovenfor hverandre. Disse stavene påføres en vekslende like- og radiofrekvent spenning, noe som medfører at det dannes et oscillerende elektromagnetisk felt (Ekeberg

2014). De parallelle stavene har samme ladning, mens stavene ved siden av hverandre har motsatt ladning. Ionene påvirkes av det elektromagnetiske feltet, og tiltrekkes og frastøtes de ulike stavene. Kvadrupolen benytter seg av det oscillerende elektromagnetiske feltet for å separere ioner etter deres m/z . Ionene med valgt m/z vil fraktes gjennom kvadrupolen, men de resterende vil kolliderer med kvadrupolstavene.

En trippelkvadrupol er bygget opp av 2 kvadrupoler skilt av en kollisjonscelle. De to kvadrupolene fungerer som masseanalyserer, og separerer ioner basert på deres m/z . Kollisjonscellen vil, i motsetning til kvadrupolene, kun være påført en radiofrekvent spenning. En av de metodene der kollisjonscellen kan benyttes, er med en inert gass. Ionene vil fragmentere når de kolliderer med gassmolekylene, og fragmentene vil deretter separeres i den neste kvadrupolen. Denne fragmenteringen kalles kollisjonsindusert dissosiering, CID. De ladde ionene og fragmentene som er dannet for en analytt, vil være de samme ved repeterbare betingelser. Disse kan derfor benyttes for å identifisere og kvantifisere analyttene.

Trippelkvadrupolen kan benyttes på flere ulike måter. En av disse er MRM, multiple reaction monitoring. Med MRM selekteres utvalgte ioner i både første og andre kvadrupol, der fragmentering forekommer i kollisjonscellen. Spesifikke ioneoverganger kan dermed benyttes for å kvalitativt og kvantitativt identifisere en analytt. En annen metode er et produktionskann. Den første kvadrupolen vil da selektere en bestemt m/z , som deretter vil fragmenteres i kollisjonscellen. Alle fragmentene vil bli sendt gjennom den andre kvadrupolen til detektoren. Ved et produktionskann vil alle ionene som produseres ved fragmentering av et gitt forløperion detekteres.

3 Eksperimentelt

3.1 Kjemikalier, gasser, løsninger og reagenser

Hvilke kjemikalier, gasser, løsninger, reagenser, standarder og utstyr som er benyttet fremkommer i Tabell A 2 - Tabell A 4, Vedlegg A.

3.2 Prøver

Det ble benyttet avløpsvann fra Vestfjorden avløpsselskap. 40 L utløpsvann ble hentet 18. januar 2016, og 20 L ble hentet 29. mars 2016. Den 29. mars ble det i tillegg hentet 10 L innløpsvann. Prøvene er såkalte døgnblandprøver, der avløpsvannet er samlet på plasttønner over en 24 timers periode.

Prøvene ble overført fra 30 L polyetylen plasttønner, inneholdende 15 - 18 L vann, til tomme, rene løsemiddelflasker á 1 L og 2,5 L av mørkt glass. På forhånd var disse vasket med grad 1 Milli-Q vann fra Millipore. Før avløpsvannet ble overført til flaskene, ble vannet rørt om ved hjelp av en kost. Dette for å sikre en homogen fordeling av partikulært materiale samt annet materiale som hadde sedimentert til bunnen og festet seg til veggene i tønna.

Etter prøvetakingen ble flaskene fraktet via bil tilbake til Kjemilaboratoriet ved NMBU Institutt for Mattrygghet og infeksjonsbiologi (MatInf) på Adamstuen. Der ble prøvene filtrert, og deretter lagret på et kjølerom ved 6°C frem til prøveopparbeidelse. For informasjon om videre prøveopparbeidelse, se avsnitt 3.8.

3.3 Tillaging av standarder

Av de 15 utvalgte legemidlene samt sulfadoxin, ble det laget stamløsninger på 1mg/mL. Disse ble opparbeidet, og lagret i et Whirlpool class a kjøleskap ved 4,5 °C. Sulfadoxin ble benyttet for å kunne optimalisere kromatografiske parametere og massespektrometerparametere for internstandard, sulfadoxin-D₃. I tillegg ble sulfadoxin brukt for optimalisering av QuEChERS ekstraksjonen for gitt internstandard. Under lagring var standardløsningene dekket med parafilm. Standardløsningenes vekt før og etter hvert uttak, og før og etter tildekking med parafilm, ble notert i en standardbok. Dette for å kunne avdekke, og korrigere for eventuell signifikant løsemiddelfordampning under lagring, og for å kunne kontrollere et

presist uttak av standardene. Videre ble prøveglassene som standardløsningene ble overført til veid før og etter overføring. Før det ble foretatt uttak fra standardløsningene, ble disse satt på benken frem til de nådde romtemperatur. Etter uttak ble løsningene umiddelbart satt tilbake i kjøleskap.

De løsemidlene som ble benyttet, samt holdbarheten til stamløsningene på 1 mg/mL, er testet og oppgitt av MatInf, er illustrert i Tabell 3-1. For standarder der stamløsningenes holdbarhet ikke allerede var testet av Kjemilaboratoriet, ble holdbarheten på disse, i tillegg til standardløsninger ved 10 µg/mL, testet på følgende måte: Standarder på 1 mg/mL og 10 µg/mL ble lagret i 1 måned i kjøleskap ved 4,5 °C. Samme dag som målingene ble foretatt, ble det opparbeidet nye standardløsninger på 1 mg/mL og 10 µg/mL. Arealet for de 1 måneds gamle løsningene ble deretter sammenlignet med arealet til de nylagede standardløsningene. I de tilfellene der stamløsningen eller standardløsningen viste signifikant lavere areal i den 1 måneds gamle standarden i forhold til den nylagede standarden, kunne det konkluderes med en holdbarhet på mindre enn én måned.

Før måling på HPLC-MS/MS, ble stamløsningene til holdbarhetstesten fortynnet til 200 ng/mL. Ved måling av koffein og ibuprofen ble stamløsningene fortynnet til 2 µg/mL. Videre ble standardløsningene på 10 µg/mL fortynnet til 1 µg/mL.

Tabell 3-1 Løsemiddel benyttet til stamløsninger på 1 mg/mL, og oppgitt holdbarhet på disse fra Kjemilaboratoriet.

Legemiddel	Løsemiddel	Oppgitt holdbarhet på stamløsning ved 4,5°C
Acetylsalisylsyre	MeOH	
Amlodipin	DMSO	
Benzylpenicillin	Vann	Opptil 1 uke
Ciprofloksacin	0,03 M NaOH i vann	12 måneder*
Ibuprofen	MeOH	-
Ketoprofen	MeOH	8 måneder
Koffein	MeOH	-
Losartan	DMSO	-
Metoprolol	DMSO	-
Metronidazol	MeOH	9 måneder*
Prednisolon	MeOH	-
Simvastatin	DMSO	-
Sulfadoxin	MeOH	3 måneder
Sulfametoksazol	MeOH	3 måneder
Tetrasyklin	Vann	Opptil 1 uke
Trimetoprim	MeOH	-

* Også stabile arbeidsløsninger i konsentrasjon <1 mg/mL

3.4 Optimalisering av massespektrometerparametere

Massespektrometerparameterne for alle analyttene ble optimalisert, henholdsvis kollisjonsenergi og fragmentorspenning. Videre ble det identifisert egnede produksjoner for de ulike legemidlene. For to av legemidlene, benzylpenicillin og simvastatin, ble ikke sensitiviteten funnet tilstrekkelig, og responsen var svært lav. Der ble det derfor testet en annen celleakselerasjonsspenning enn standardinnstilling (7 V).

Optimalisering av nevnte parametere ble utført ved en direkte injeksjon uten kolonne i massespektrometeret. Det ble benyttet en løsning bestående av 95 % av 0,1 % V/V maursyre i Milli-Q vann, og 5 % av 0,1 % V/V maursyre i ACN. Videre ble det benyttet separate 100 ng/mL arbeidsløsninger av de ulike legemidlene.

For å finne egnede masseoverganger for kvantitativ analyse, ble det foretatt et produksjonskann. Analysen ble utført med varierende kollisjonsenergi mellom 0 - 50 eV, i 5 eV intervaller. Fragmentorspenningen var satt på standardinnstilling ved 135 V. Først ble det identifisert den kollisjonsenergien som ga analyttoppen med høyest areal. Flere produksjoner kunne identifiseres ved å se på massespektra fra analysen utført med topp-kollisjonsenergien, i tillegg til analysene utført for ± 5 eV av topp-kollisjonsenergien. 2 - 3 produksjoner ble valgt for hvert legemiddel, med unntak for koffein. Der ble datterionene, som i massespektra hadde høyest høyde, valgt for videre kollisjonsenergi-optimalisering.

Videre optimaliseringen av kollisjonsenergien ble utført ved MRM med HPLC-MS/MS (ESI (+)-QqQ). Kollisjonsenergiene ± 5 eV av topp-kollisjonsenergien som ble identifisert under produksjonskannet, ble testet i 2 eV intervaller. Kollisjonsenergien som ga høyest areal for de ulike produksjonene ble benyttet videre. I noen tilfeller ble det ikke funnet noe tydelig toppareal innenfor det kollisjonsenergiintervallet som ble testet, men arealet fortsatte imidlertid å øke utover i intervallet. I disse tilfellene ble flere kollisjonsenergier testet frem til topparealet. Dette fortsatt i intervall på 2 eV.

Fragmentorspenningen til de ulike produksjonene ble videre optimalisert med MRM. Det ble testet fragmentorspenning mellom 50 - 190 V, her ved 20 V intervall. I tillegg ble det testet fragmentorspenningene ± 10 V av topp-fragmentorspenningen i 5 V intervall. På samme måte

som under optimaliseringen av kollisjonsenergien, ble topparealet for hver enkelt ioneovergang identifisert.

3.5 Optimalisering av kromatografisk separasjon og ionekildeparametere

Under optimaliseringen av den kromatografiske separasjonen ble det tatt utgangspunkt i LC-metoden benyttet av Cerqueira *et al.* (2014). Det ble benyttet en Agilent Zorbax Eclipse Plus, C₁₈ RRHD kolonne, med diameter 2,1 mm, lengde 100 mm og 1,8 µm partikkelstørrelse. Forkolonnen var en Agilent UHPLC fast guard Eclipse C₁₈ kolonne, med diameter 2,1 mm, lengde 5 mm og 1,8 µm partikkelstørrelse.

Mobilfase A besto av 0,1 % maursyre i vann : MeOH med forhold 98 : 2 V/V, og mobilfase B av 0,1 % maursyre i MeOH. På grunn av den høyere elueringsstyrken til ACN sammenlignet med MeOH ved omvendt-fase applikasjoner (Gilar *et al.* 2014), ble det forventet at ACN ville gi en bedre separasjon med smalere topper enn MeOH. Det ble derfor valgt å optimalisere med 0,1 % maursyre i vann som mobilfase A, og 0,1 % maursyre i ACN som mobilfase B.

En løsning med konsentrasjon 100 ng/mL inneholdt 13 av de 15 legemidlene i tillegg til sulfadoxin. Denne løsningen ble benyttet under optimaliseringen av HPLC-MS/MS-parameterne. Benzylpenicillin og tetrasyklin ble optimalisert med en konsentrasjon på 200 ng/mL, og koffein og simvastatin hadde en konsentrasjon på 10 µg/mL. På grunn av problemer med å optimalisere massespektrometerverdiene; kollisjonsenergi og fragmentorspenning, ble ikke ibuprofen og metoprolol benyttet under denne optimaliseringen. For nevnte legemidler var det også problemer med å identifisere egnede produksjon. Det ble senere testet muligheten for å forkorte metoden ved å øke mobilfasegjennomstrømningshastigheten, og testet ulike kolonneovnstemperaturer. Under disse testene ble det benyttet en løsning som inneholdt alle de 15 legemidlene, inkludert ibuprofen og metoprolol, i tillegg til sulfadoxin. Ved disse testene ble det brukt en standardløsning med konsentrasjon 200 ng/mL for 13 av legemidlene. Koffein ble imidlertid tilsatt ved 1 µg/mL og ibuprofen som ble tilsatt ved 600 ng/mL.

Under utvikling av LC-metoden ble det, som nevnt, tatt utgangspunkt i gradienten gitt av Cerqueira *et al.* (2014), med en gjennomstrømningshastighet for mobilfase på 0,225 mL/min. Gradienten er gitt i Tabell 3-2.

Tabell 3-2 Gradienten benyttet som et utgangspunkt under metodeutviklingen, gitt av Cerqueira *et al.* (2014). Mobilfasegjennomstrømningshastigheten er 0,225 mL/min.

Minutter	% mobilfase A
0 - 0,25	95
0,25 - 7,75	95 - 0
7,75 - 8,5	0
8,5 - 8,51	0 - 95
8,51 - 10	95

De generelle HPLC-parameterne som er benyttet, fremkommer i Tabell A 5, Vedlegg A. Parameterne gitt i tabellen har ikke blitt optimalisert. For å forebygge krysskontaminering, ble det foretatt nålevask mellom hver injeksjon. Vaskeløsningen besto av 50 % MeOH og 50 % vann.

Metoden til Cerqueira *et al.* (2014) viste seg å være for kort til å oppnå en tilstrekkelig separasjon av de ulike legemidlene. Den ble derfor optimalisert videre for å kunne sikre en tilstrekkelig separasjon av legemidlene. I tillegg slik at kolonnen fikk reekvilibrert seg mellom hver injeksjon, samtidig som analysetiden forble så kort som mulig.

For å teste sistnevnte parameter, ble analysetiden forkortet ved å øke mobilfasegjennomstrømningshastigheten til 0,450 mL/min. De ulike metodene som ble testet er illustrert i Tabell 3-3. Det ble kjørt 4 injeksjoner per metode. Dette for å sikre at det oppnådde arealet hadde rukket å stabilisere seg etter endringene i metoden.

Tabell 3-3 Metoder testet for å se om HPLC-metoden kunne forkortes. Metode 1 har gjennomstrømningshastighet 0,225 mL/min. De andre har 0,450 mL/min.

% mobilfase A	Metode 1	Metode 2	Metode 3	Metode 4	Metode 5	Metode 6
95 %	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min	0 min
95 %	0,25 min	0,25 min	0,25 min	0,25 min	0,25 min	0,25 min
80 %	4 min	3,5 min	3 min	2,5 min	2,5 min	2 min
60 %	7,5 min	6,5 min	5,5 min	4,5 min	4 min	4 min
35 %	10 min	8,5 min	7 min	5,5 min	5 min	5 min
15 %	13 min	11 min	9 min	7 min	6 min	6 min
0 %	15 min	12,5 min	10 min	7,5 min	7 min	7 min
0 %	18 min	15 min	12 min	9 min	9,5 min	9 min
95 %	20 min	16,5 min	13 min	9,5 min	10,5 min	10 min
95 %	26 min	22 min	18 min	14 min	14 min	13 min

Videre ble kolonneovnstemperaturen optimalisert, der temperaturer mellom 20 - 50 °C ble testet i 10 °C intervall. I temperaturvinduet mellom 20°C og 30 °C, ble optimaliseringen gjennomført med 5 °C intervall. 4 injeksjoner ble kjørt per kolonnetemperatur. Dette for å sikre at resultatene hadde rukket å stabilisere seg etter temperaturendringen.

De ulike ionekildeparametrene ble optimalisert. Dette inkluderte gasstemperatur, sheath gasstemperatur, forstøvertrykk, kapillærspenning og dysespennning. Gassgjennomstrømningen ble satt til 10 L/min, og sheath gassgjennomstrømningen til 11 L/min. Det ble testet med varierende dysespennning ved 0 V, 500 V, og 1000 V, kapillærspenning ved 2500 V, 3500 V og 5000 V, gasstemperatur på 300, 325 og 350 °C samt sheath gasstemperatur på 300, 325, 350 og 375 °C. Videre ble det testet å variere nebulizergass-trykket ved 10, 20, 25, 30, 40, 45 og 50 psi.

Det ble valgt de parameterverdiene som ga høyest toppareal for flest mulig legemidler.

3.6 QuEChERS optimalisering

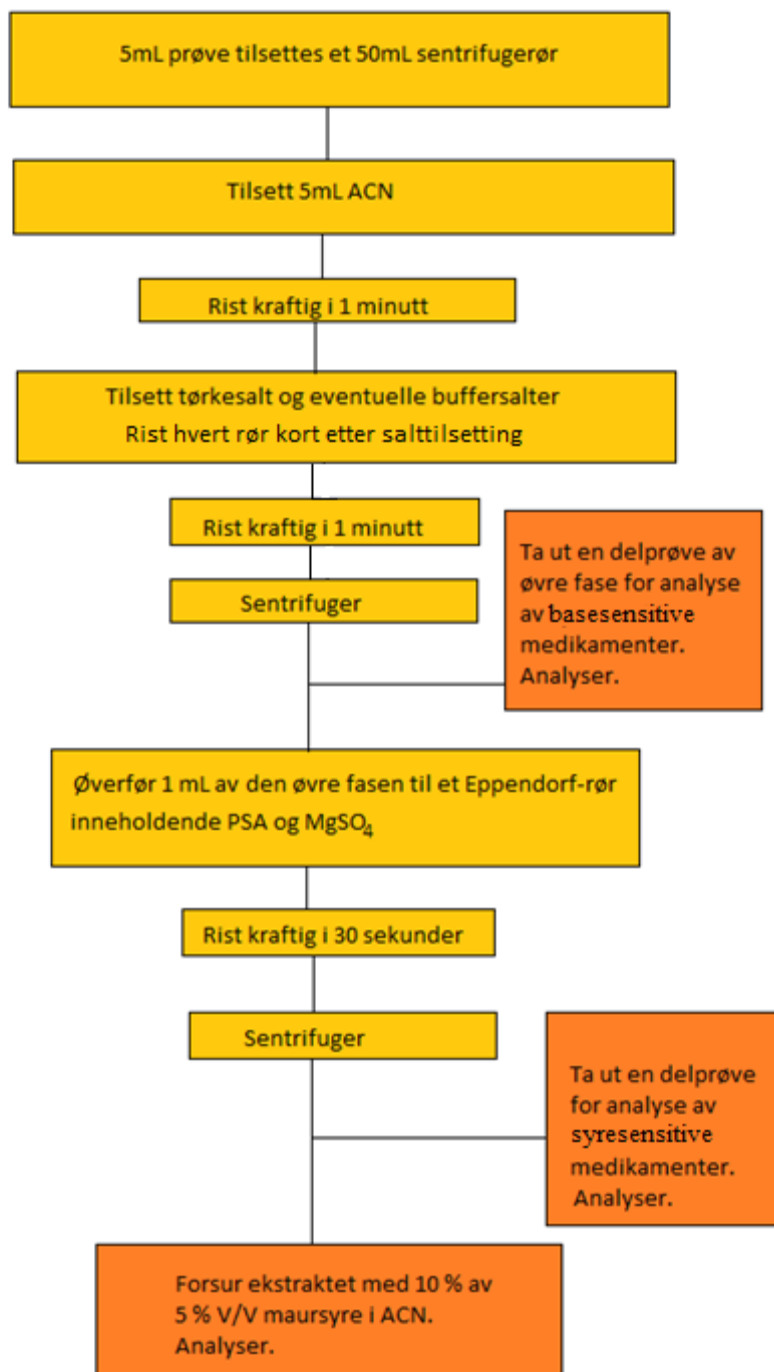
Under optimaliseringen ble det benyttet ren standardblanding løst i vann. QuEChERS ekstraksjonen ble utført ved at 5 mL av prøven ble blandet med 5 mL ekstraksjonsmiddel i et sentrifugerør. Standardblandingen inneholdt;

- 0,2 $\mu\text{g/mL}$ metronidazol, ciprofloksacin, ketoprofen, prednisolon, trimetoprim, losartan, sulfadoxin, sulfametoksazol og amlodipin
- 0,4 $\mu\text{g/mL}$ tetrasyklin og simvastatin
- 0,8 $\mu\text{g/mL}$ ibuprofen, benzylpenicillin og acetylsalisylsyre
- 5 $\mu\text{g/mL}$ koffein

Da sulfadoxin-D₃ skulle benyttes som internstandard ved senere arbeid, ble metoden optimalisert for sulfadoxin. På grunn av begrenset mengde av internstandard, ble selve optimaliseringen utført ved bruk av det native legemiddelet.

Etter tilsetning av ekstraksjonsmiddel, ble løsningen ristet kraftig i ett minutt. Deretter ble det tilsatt buffer- og ekstraksjonssalter. For å hindre agglomerering av saltene, ble hvert enkelt rør ristet i kort tid ved bruk av en vortex. Avslutningsvis ble alle rørene ristet på nytt i ett minutt. Deretter ble det foretatt en sentrifugering. Dersom ikke annet er spesifisert, ble det ved alle ristestegene benyttet en ristemaskin ved høyest hastighet.

Etter sentrifugeringen var det dannet to separate faser, der legemidlene befant seg i den øvre fasen. En delprøve av denne ble analysert på HPLC-MS/MS, og 1 mL ble overført til et Eppendorfrør-rør som inneholdt tørkesalt og PSA. Rørene ble deretter ristet i 30 sekunder, for så å bli sentrifugert. Før måling på HPLC-MS/MS, ble en delprøve på 650 μL av sluttekstraktet forsuret med 6,5 μL av 5 % V/V maursyre i ACN. Den andre delprøven av sluttekstraktet ble målt uten forsuring. Metoden er illustrert i Figur 3-1.



Figur 3-1 Flytskjema for metoden som ble benyttet som et utgangspunkt under optimaliseringen av QuEChERS ekstraksjonen.

Flere trinn ble optimalisert, og det ble testet 2 - 6 paralleller per optimaliseringstrinn. Under optimaliseringen ble arealene for 13 av de 15 legemidlene og sulfadoxin sammenlignet. Det ble valgt ut de parameterne som ga høyest areal for flest mulig forbindelser, uten å påvirke responsen til et legemiddel i tydelig negativ retning. Kun resultater oppnådd samme dag ble

sammenlignet. Dette på grunn av mulig variasjon i instrumentrespons over måleperioden. På grunn av problemer med optimalisering av spesifikke massespektrometerverdier for metoprolol, se avsnitt 3.5, ble ikke dette legemiddelet benyttet under denne optimaliseringen. Optimaliseringen av metoprolol sine spesifikke massespektrometerverdier var alle foretatt før arbeid i matriks, og denne ble derfor benyttet sammen med de andre legemidlene. Videre var det foretatt en forenklet optimalisering av de ulike QuEChERS parameterne for metoprolol, henholdsvis tørke- og buffersalt, samt forsuring av ekstraksjonsmiddelet, ble utført for metoprolol før matrikstestene startet.

Ekstraksjonsmidlene som ble testet var ACN og MeOH. Det ekstraksjonsmiddelet som viste seg mest egnet ble deretter forsuret med 1 % V/V eddiksyre ($C_2H_4O_2$) og 1 % V/V maursyre (CH_2O_2).

Både EN-metoden, AOAC metoden og ubuffret metode ble testet, se avsnitt 2.2. Den ubuffrede metoden benyttet 0,4 g/mL prøve med $MgSO_4$, og 0,1 g/mL prøve med NaCl (Anastassiades *et al.* 2003). EN-metoden benyttet de samme saltene, men i tillegg ble det benyttet 0,1 g/mL $Na_3-Cit-2H_2O$ og 0,05 g/mL $Na_2Cit-1.5H_2O$ (BRITISH STANDARD 2008). I AOAC metoden ble det benyttet samme mengde $MgSO_4$, mens det ble brukt 0,1 g/mL NaOAc, istedenfor NaCl (Lehotay *et al.* 2005b). Videre ble det testet å tilsette 0,1 g/mL Etylendiamintetraeddiksyre-dinatriumsalt, Na_2EDTA , sammen med saltene til EN-metoden. Alle buffermetodene ble deretter testet med natriumsulfat, Na_2SO_4 , som tørkesalt, istedenfor $MgSO_4$.

Det ble benyttet ulike mengder PSA, her 12,5, 25, 37,5, 50 og 75,5 mg/mL. Mengden tørkesalt ble holdt konstant på 150 mg/mL. Videre ble det testet virkningen av å utelukke dSPE-steget, og istedenfor benytte en *n*-heksanopprensning. Ved en *n*-heksanopprensning tilsettes 1,67 mL *n*-heksan i tillegg til 5 mL ACN. Etter første sentrifugeringstrinn vil *n*-heksanfasen befinne seg i en separat øvre fase. Denne fjernes, og ekstraksjonsmiddelfasen ble så tilsatt 50 μ L DSMO. Deretter ble de dampet ned med trykkluft, for så å rekonstitueres i samme mengde ekstraksjonsmiddel. En delprøve ble målt direkte på HPLC-MS/MS, mens den andre delprøven ble tilsatt 1 % V/V av 5 % maursyre i ACN før analyse.

Videre ble ekstraksjonstiden optimalisert, der prøvene fikk hvile etter tre ristesteg. Ristestegene ble utført etter at:

- Prøven ble blandet med ekstraksjonsmiddel
- Buffersaltene ble tilsatt
- Prøven ble tilsatt dSPE-rørene

Ekstraksjonstidene som ble testet var 1, 5 og 10 minutter. En ekstraksjonstid på 1 minutt, vil si ingen videre ekstraksjonstid utover ristetiden på 1 minutt etter tilsetning av hver komponent.

Deretter ble sentrifugeringstid og sentrifugeringshastighet optimalisert. Hastighetene som ble testet var 1500 rpm, 3000 rpm og 4500 rpm, og sentrifugeringstidene som ble testet var 5, 10 og 15 minutter. Sentrifugeringshastigheten i g er oppgitt i Tabell 3-4.

Tabell 3-4 Sentrifugeringshastigheten omformet fra rpm til g for de to sentrifugene benyttet

	Rotanta 50mL	Micro 1207
	Ekstraksjonssteget	dSPE-steget
1500rpm	377 g	100 g
3000 rpm	1509 g	600 g
4500 rpm	3396 g	1800 g

3.7 Neddampingstester

For å kunne studere eventuell effekt av neddampingen på legemidlene, ble 12 paralleller á 5 mL av samme løsning som ble benyttet under QuEChERS optimaliseringen (se avsnitt 3.6), dampet ned for deretter å rekonstitueres i Milli-Q vann. Neddampingen foregikk uten temperaturkontroll. Halvparten av prøvene ble tilsatt 50 μ L DMSO før neddampingen ble foretatt.

3 paralleller med og 3 paralleller uten tilsatt DMSO, ble analysert direkte på HPLC-MS/MS etter neddampingen. De resterende 6 parallellene gjennomgikk en QuEChERS ekstraksjon etter neddampingen før de ble analysert. Det ble testet neddamping med både trykkluft og nitrogen. Dette for å kunne se om valg av neddampingsmetode påvirket legemidlene i ulik grad.

3.8 Metodetest i matriksprøver

Det var ikke mulig å finne matriks uten de valgte legemiddelrestene. Alt arbeidet med matriks under metodeoptimaliseringen, ble derfor utført ved å spike utløpsvann hentet fra VEAS med de 15 ulike legemidlene samt sulfadoxin.

3.8.1 Prøvetaking

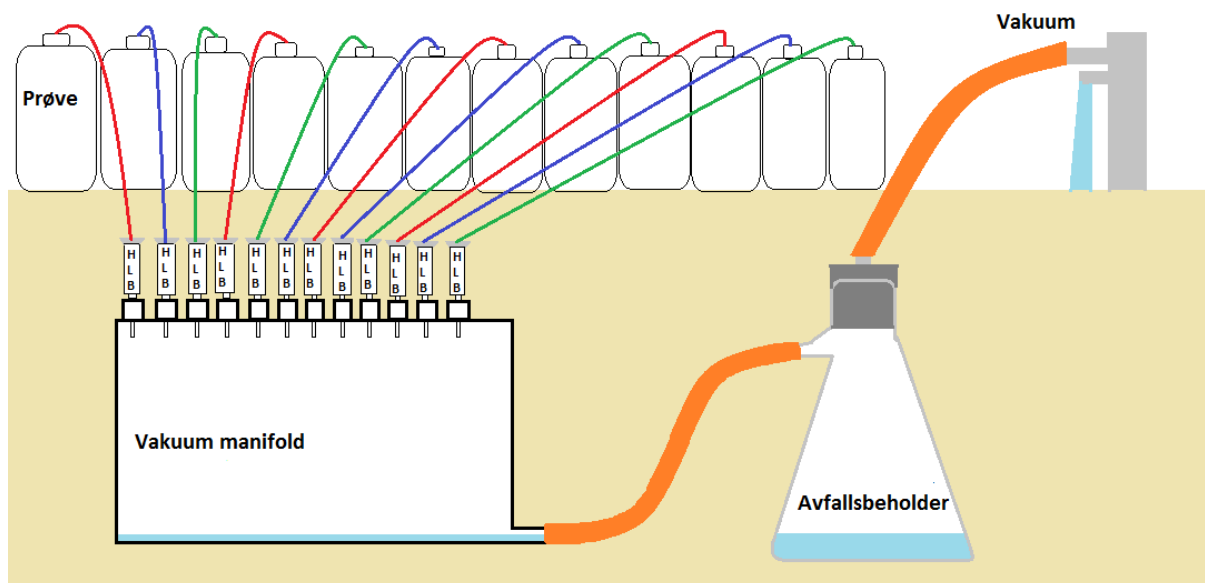
Den 18. januar 2016 ble 40 L utløpsvannprøver hentet fra VEAS. Det ble benyttet vann fra 3 ulike tønner. Utløpsvannprøvene ble filtrert med glassmikrofiberfilter med 1,2 μm porestørrelse. Ett filter ble brukt per 500 mL. Etter filtreringen ble utløpsvannet fordelt i prøver på 1 L. Prøvene ble lagret på et kjølerom ved 6°C frem til analyse. På grunn av instrumentproblemer ble prøvene lagret frem til 14. mars 2016.

3.8.2 Prøveopparbeiding

Til metodetesten ble det benyttet 6 L utløpsvann, der 1 prøve besto av 1 L.

Før QuEChERS ekstraksjonen ble foretatt, ble utløpsvannprøvene oppkonsentrert ved hjelp av Oasis HLB-kolonner (12cc Vac Cartridge, 500 mg sorbent, 60 μm partikkelstørrelse, porestørrelse 80 Å). Dette ligner fremgangsmåten til Gunatilake *et al.* (2013) og Gunatilake *et al.* (2014), der de analyserte østrogen i avløpsvann ved hjelp av en modifisert QuEChERS ekstraksjon.

Oasis HLB kolonnene ble kondisjonert med 5 mL MeOH og ekvilibrert med 5 mL Milli-Q vann. Denne fremgangsmåten er gitt av Waters Corporation (2014). Det ble deretter dannet en kobling mellom kolonnen og flasken med prøve. Prøven ble påført med en gjennomstrømningshastighet på 1 - 2 mL/min under vakuum ved -5 "Hg. Oppsettet er illustrert i Figur 3-2.



Figur 3-2 Prøvepåføring på HLB-kolonnene via adaptere for stor-volum-SPE. Prøvene står høyere enn vaku-manifolden.

Da beholderen ble tom, ble den vasket med 10 mL vann, og vannet ble deretter på nytt påført kolonnen. Kolonnen ble vasket med 5 mL 5 % V/V MeOH i vann, før den ble tørket under vaku ved -5" Hg i 30 minutter. Prøven ble deretter eluert med 10 mL MeOH ved en gjennomstrømningshastighet på 1 - 2 mL/min under vaku på -5 "Hg.

3 av 6 prøver ble brukt som blindprøver, der en av blindprøvene ble tilsatt internstandardene; ibuprofen-D₃, sulfadoxin-D₃ og koffein-¹³C₃. De resterende 3 prøvene ble spiket med alle de 15 legemidlene, sulfadoxin, og internstandardene. Tre QuEChERS metoder skulle testes; ubufret metode, EN metoden og EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA. I alle de tre tilfellene ble det benyttet Na₂SO₄ som tørkemiddel. De spikede prøvene ble spiket til en sluttkonsentrasjon på

- 0,2 µg/mL for prednisolon, trimetoprim, ciprofloksacin, metronidazol, metoprolol, losartan, amlodipin, simvastatin, ketoprofen, sulfadoxin, sulfametoksazol, og sulfadoxin-D₃
- 0,4 µg/mL for tetrasyklin, acetylsalisylsyre og ibuprofen-D₃
- 0,8 µg/mL for ibuprofen
- 1,6 µg/mL for benzylpenicillin, koffein og ¹³C₃ koffein.

Legemidlene ble som nevnt eluert ut fra Oasis HLB-kolonnen med 10mL MeOH. Eluatet ble delt i 3. Dette for å kunne studere effekten av 3 ulike QuEChERS metoder alene, uten å måtte ta hensyn til eventuelle variasjoner i arealene som kommer fra SPE-ekstraksjonen. Prøvene ble tilsatt 50 µL DMSO og dampet ned med trykkluft uten temperaturkontroll. De tre

delekstraktene gjennomgikk én av QuEChERS ekstraksjonene hver. Under metodevalideringen og arbeid med innløpsvannprøvene, ble det eluerte volumet arbeidet med videre i sin helhet.

Før QuEChERS ekstraksjonen ble utført, ble alle delprøvene rekonstituert til 5 mL med Milli-Q vann. Før analysen ble foretatt ble de oppnådde ekstraktene sentrifugert gjennom et Spin-X-filter (nylon sentrifugefilter med porestørrelse 0,22 μm) ved 7 200g i 1 minutt. Ved en feil ble ikke gjenfinningsstandard metoprolol-D₇ hydroklorid tilsatt, og gjenfinning i ekstraktene kunne derfor ikke bestemmes. I alle ekstrakter som ble analysert under metodevalideringen og ved analyse av innløpsvannprøvene, ble gjenfinningsstandard tilsatt rett før analyse. Dette ved konsentrasjon på 0,2 $\mu\text{g/mL}$.

3.9 Metodevalidering

For å evaluere metoden sin egnethet for analyse av de 15 legemidlene samt sulfadoxin i avløpsvann, ble det utført en forenklet validering. De parameterne som skulle evalueres var linearitet, sensitivitet, nøyaktighet, presisjon og gjenfinning. På grunn av tidsmangel ble det ikke utført en fullstendig validering. Det ble benyttet utløpsvann hentet fra VEAS 18. januar 2016. For prøvetakingsregime og fremgangsmåte, se avsnitt 3.6 og 3.8. Ferdig metode er illustrert i Figur 4-3, se avsnitt 4.1.6.

Det ble utført en linearitetstest bestående av en linearitetsrekke over 7 nivåer, dette inkludert matriksblind. Videre ble det opparbeidet 5 kontrollprøver på to av nivåene i linearitetsrekken. Disse skulle, sammen med prøven på samme nivå fra linearitetsrekken, benyttes for å studere nøyaktighet og presisjon. Ved å måle standarden som ble benyttet til spikingen over de 2 nivåene, ble disse prøvene også benyttet til å studere gjenfinningen. For å studere R^{MS} , ble de ulike legemidlene spiket til matriksblind rett før analyse på HPLC-MS/MS.

Linearitetsrekkens 7 nivåer var 0 ng/mL (matriksblind), 25 ng/mL, 50 ng/mL, 100 ng/mL, 300 ng/mL, 600 ng/mL og 1200 ng/mL. Da det var forventet en svært varierende konsentrasjon av de ulike legemidlene i avløpsvann ble det valgt å studere presisjonen i både det øvre og det nedre konsentrasjonsområdet i linearitetsrekken. Presisjonsnivåene som ble valgt var 100 ng/mL og 600 ng/mL. Koffein ble tilsatt med dobbelt konsentrasjon i alle de spikede prøvene, det vil si 0 ng/mL (matriksblind), 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL, 600 ng/mL, 1200 ng/mL og 2400 ng/mL. Videre ble det opparbeidet en reagensblind der 1 L Milli-Q vann gjennomgikk prøveopparbeidingen. Sulfadoxin- D_3 ble tilsatt alle prøvene ved 400 ng/mL, ibuprofen- D_3 ved 600 ng/mL og koffein- $^{13}C_3$ ved 2000 ng/mL. Videre ble det opparbeidet en separat matriksblind, uten tilsatt internstandarder. Det var denne matriksblinden som ble spiket for å studere R^{MS} . Ved en feil ble ikke internstandardene tilsatt reagensblinden.

På grunn av for få adaptere for stor-volum SPE, var det begrenset hvor mange prøver som kunne opparbeides samtidig. Linearitetstesten måtte derfor utføres over to dager. Begge dagene ble det opparbeidet en fullstendig linearitetsrekke og reagensblind, samt 5 kontrollprøver på ett nivå. På grunn av problemer med HPLC-MS/MS instrumentet, ble alle de opparbeidede prøvene analysert samme dag. Ved feilsøking av instrumentet ble det benyttet en annen kolonne, men med samme spesifikasjoner. Denne kolonnen ble deretter

benyttet til analyse av de prøvene som ble opparbeidet for metodevalideringen. En linearitetsrekke ble opparbeidet med rene standarder i Milli-Q vann på samme nivå som de som ble opparbeidet i matriks. Disse ble målt ved starten av analysen, og mellom prøvene opparbeidet på de to forskjellige dagene. Prøver opparbeidet dag 1 ble lagret ved 4,5 °C frem til analyse.

Avslutningsvis ble det utført en ionsuppresjonstest. Analytt ($10\mu\text{g/mL}$) ble kontinuerlig innført til MSen fra en sprøytepumpe via en T-kobling, mens matriksblind ble injisert på HPLC-kolonnen. Endring i responsen indikerer en negativ eller positiv matrikseffekt.

3.10 Avløpsvannprøver

Etter metodeevalueringen ble den optimaliserte metoden benyttet til å studere legemiddelkonsentrasjonen i innløpsvann. 18 L utløpsvann og 10 L innløpsvann ble hentet fra VEAS 29. mars 2016. For prøvetakingsregime, se avsnitt 3.8.1.

Ved filtrering av innløpsvann var det nødvendig med ett filter per 100 mL prøve, mens det ved utløpsvannet kun var nødvendig med ett filter per 500 mL prøve. Prøveopparbeidelsen av innløpsvannet var ellers sammenlignbart med utløpsvannprøvene, se avsnitt 3.6 og 3.8. Sluttmetoden er illustrert i Figur 4-3, se avsnitt 4.1.6.

På grunn av for få adaptere for stor-volum-SPE, var det nødvendig å analysere innløpsvannet over en 2 dagers periode. Ved hver analysedag ble det opparbeidet den samme linearitetsrekken som ble benyttet under metodevalideringen, se avsnitt 3.9. Videre ble det opparbeidet to kontrollprøver, en for hver av de to nivåene studert under metodevalideringen. I tillegg til linearitetsrekken og kontrollprøvene, ble det opparbeidet 5 prøver á 1 L innløpsvann til hver analysedag. 2 prøver á 1 L Milli-Q vann ble benyttet som feltblind under prøvetakingen. Én av disse ble opparbeidet sammen med de resterende prøvene til hver analysedag. For å kunne analysere for koffein, ble en delprøve av innløpsvannprøven fortynnet 1/10.

Avslutningsvis ble det utført en ionesuppresjonstest, ved injeksjon av prøvematriks av innløpsvann. For fremgangsmetode, se avsnitt 3.9.

4 Resultat og diskusjon

4.1 Metodeoptimalisering

4.1.1 Standardstabilitet

Som nevnt i avsnitt 3.3 ble stabiliteten for alle standardene som tidligere ikke var testet ved Kjemilaboratoriet ved MatInf, testet etter å ha vært lagret i 1 måned. Det ble testet stamløsningene på 1 mg/mL og standardløsninger på 10 µg/mL for acetylsalisylsyre, amlodipin, ibuprofen, koffein, losartan, metoprolol, prednisolon, simvastatin og trimetoprim.

Resultatet er vist i Tabell 4-1. Rådata er gitt i Tabell A 6, Vedlegg A. I Tabell A 7, Vedlegg A, er også holdbarheten på alle legemidlenes stamløsning på 1 mg/mL og standardløsning på 10 µg/mL gitt samlet. I de tilfeller hvor de 1 måned gamle standardene ga signifikant lavere areal enn de nylagede standardene, var dens stabilitet kortere enn 1 måned.

Tabell 4-1 Stabiliteten til stamløsning på 1 mg/mL og standardløsning på 10 µg/mL for 9 legemidler over 1 måned ved 4,5 °C.

Legemiddel	Stamløsning 1 mg/mL	Standardløsning 10 µg/mL
Acetylsalisylsyre	≤1 måned	≤1 måned
Amlodipin	≤1 måned	> måned
Ibuprofen	≤1 måned*	≤1 måned
Koffein	≤1 måned	> måned
Losartan	≤1 måned	≤1 måned
Metoprolol	≤1 måned	≤1 måned
Prednisolon	> måned	> måned
Simvastatin	≤1 måned	≤1 måned
Trimetoprim	> måned	> måned

* 1 måned gammel stamløsning ga høyere areal enn nylaget stamløsning. Det er ikke mulig å bekrefte hva som er årsaken, men det har trolig forekommet løsemiddelfordamping under lagring.

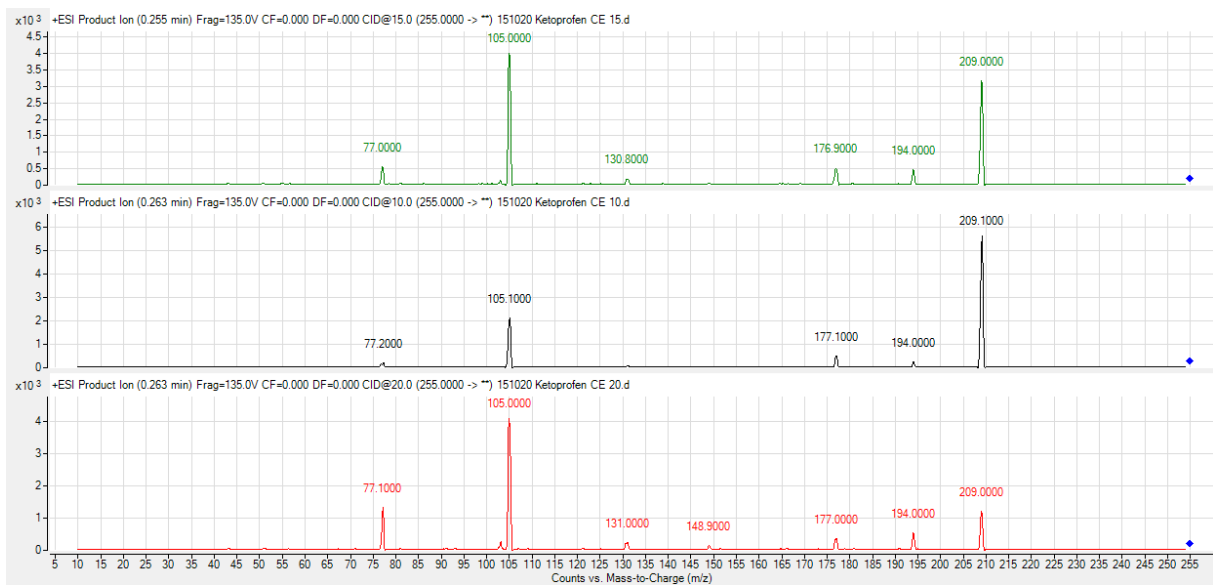
4.1.2 Optimalisering av massespektrometerparametere

Som nevnt i avsnitt 3.4 ble massespektrometerparameterne; kollisjonsenergi og fragmentorspenning, optimalisert for de 15 utvalgte legemidlene samt sulfadoxin. Egnede produktion ble også identifisert for legemidlene. De optimaliserte parameterne er gitt i Tabell A 8, Vedlegg A. Kvantifiseringsionene til de ulike legemidlene er understreket i samme tabell. Hvordan de ulike parameterne er optimalisert er illustrert for ketoprofen i Tabell 4-2 - Tabell 4-5 og Figur 4-1. Kun ett ion ble optimalisert for koffein. Dette fordi sensitiviteten kun var å anse som tilstrekkelig for det ene identifiserte produktionet.

Tabell 4-2 Areal målt ved et produktionskann ved kollisjonsenergi 0 - 50 V for ketoprofen. Forløperionets har m/z 255.

Kollisjonsenergi i V	Areal
0	83 388
5	240 598
10	288 026
15	345 156
20	264 492
25	224 251
30	260 872
35	258 237
40	230 094
45	214 163
50	225 675

Tabell 4-2 viser tydelig at kollisjonsenergien 15 V ga høyest areal. Massespektra fått ved kollisjonsenergi mellom 10 - 20 V viser at produktionene 209 og 105 skiller seg ut, da disse var langt høyere enn for de andre. Dette er illustrert i Figur 4-1. Det ble derfor valgt å teste disse overgangene ved MRM, se avsnitt 3.4, der kollisjonsenergien skulle varieres fra toppkollisjonsenergien ± 5 V, i dette tilfellet 10 V - 20 V.



Figur 4-1 Massespektra fra produksjonskann (PI) av ketoprofen med kollisjonsenergi 10 - 20 V. Forløperionet har m/z 255.

Tabell 4-3 Arealet til ketoprofen sine to utvalgte produktion ved ulike kollisjonsenergier

Kollisjonsenergi i V	Overgang 255→105	Overgang 255→209
6		31 263
8		36 466
10	15 298	30 636
12	21 742	29 657
14	24 784	23 465
16	28 573	17 497
18	30 370	11 584
20	29 937	7 023
22	30 105	

Det ble ikke alltid identifisert en optimal kollisjonsenergi innenfor kollisjonsintervallet ± 5 V av toppkollisjonsenergien identifisert under produksjonskannet, se avsnitt 3.4. I disse tilfellene ble flere kollisjonsenergier testet for å finne optimal kollisjonsenergi. Dette var tilfellet for ketoprofen, der arealet for overgangen 255 \rightarrow 209 fortsatte å stige ved 10 V. Ved overgangen 255 \rightarrow 105 hadde det ved 20 V fortsatt ikke vist en tydelig nedgang i areal.

For ketoprofen sin overgang fra 255 \rightarrow 105 ga kollisjonsenergi 18 V - 22 V tilnærmet like høyt areal. Det ble derfor valgt å gå videre med kollisjonsenergi 20 V for denne overgangen. Overgangen 255 \rightarrow 209 viste et fortsatt stigende areal ved kollisjonsenergi 8 V, og det ble derfor testet kollisjonsenergi 6 V. Da denne kollisjonsenergien ga et lavere areal enn ved 8 V, ble det valgt å benytte kollisjonsenergi 8 V for denne overgangen.

Videre ble fragmentorspenningen optimalisert etter samme fremgangsmåte, se avsnitt 3.4. Arealet oppnådd med MRM ved de ulike fragmentorspenningene er gitt i Tabell 4-4.

Tabell 4-4 Areal for ketoprofen to utvalgte produktion ved fragmentorspenning fra 50 - 190 V.

Fragmentorspenning i V	255→105	255→209
50	4 897	10 681
70	8 764	14 653
90	17 251	22 343
110	25 712	29 392
130	26 766	23 698
150	20 040	21 886
170	9 269	11 653
190	2 225	2 321

Overgangen 255→105 viste høyest areal ved fragmentorspenningen 130 V, og det ble derfor valgt å teste fragmentorspenning mellom 120 - 140 V i 5 V intervaller, se avsnitt 3.4. Overgangen 255→209 hadde høyest areal ved 110 V, og det ble derfor videre valgt å teste fragmentorspenning mellom 100 V- 120 V.

Tabell 4-5 Areal for ketoprofen sine utvalgte produktion ved fragmentorspenning fra 100 - 120 V og 120 - 140 V.

Fragmentorspenning i V	Overgang 255→105	Overgang 255→209
100		32 227
105		35 450
110		36 021
115		36 564
120	27 632	35 496
125	25 337	
130	28 731	
135	27 181	
140	26 275	

Overgangen 255→105 viste høyest areal ved fragmentorspenning 130 V. Til tross for at differansen mellom de ulike arealene var liten, ble det konkludert med at optimaliserte parametere var ved fragmentorspenning 130 V og kollisjonsenergi 20 V.

Overgangen 255→ 209 viste høyest areal ved fragmentorspenning 115 V. Differansen i areal ved de ulike fragmentorspenningene var svært liten, og det ble observert tilnærmet likt areal ved de ulike spenningene. Det ble likevel konkludert med at denne overgangen sine optimaliserte parametere var ved fragmentorspenning 115 V og kollisjonsenergi 8 V. Videre ble det observert at denne ioneovergangen ga et generelt sett høyere areal enn 255 → 105, og

ionet ble derfor midlertidig benyttet til kvantifisering. Valg av kvantifiseringsion ble videre evaluert under metodevalideringen.

Under arbeidet med matriks og avløpsvannprøver, ble det benyttet tre internstandarder; sulfadoxin-D₃, ibuprofen-D₃ og koffein-¹³C₃, og en gjenfinningsstandard, metoprolol-D₇. De massespektrometerparameterne som ble valgt var de samme som de som ble optimalisert for deres native forbindelser; sulfadoxin, ibuprofen, koffein og metoprolol. Verdiene er gitt i Tabell A 9, Vedlegg A.

4.1.3 Optimalisering av kromatografisk separasjon og ionekildeparametere

Kromatografisk separasjon

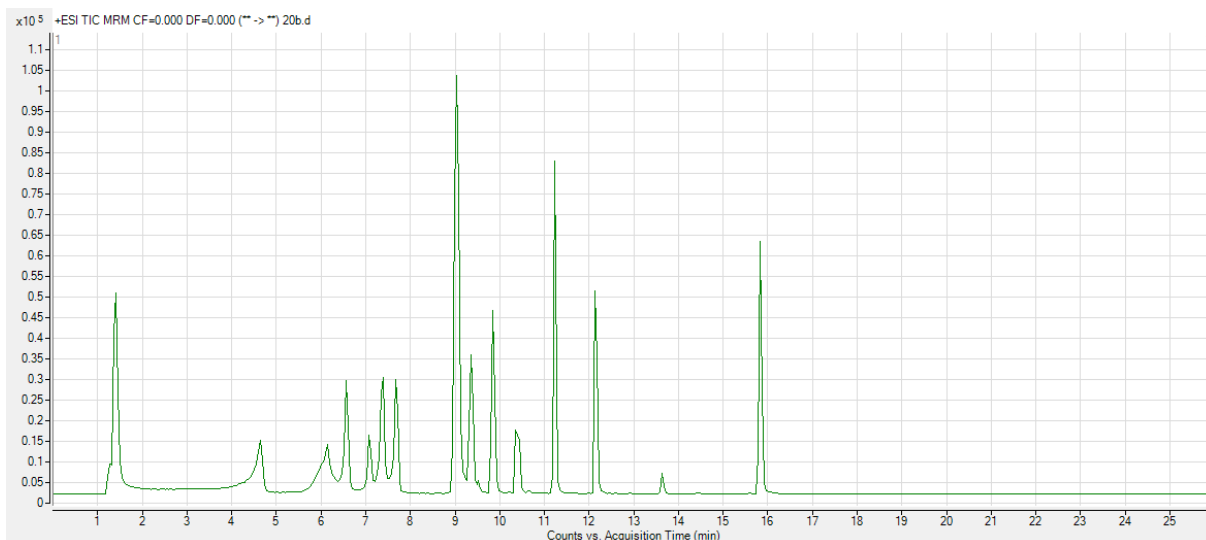
Som nevnt i avsnitt 3.5 ble det som et utgangspunkt benyttet LC-metoden til Cerqueira *et al.* (2014). Ved denne metoden eluerte flere av legemidlene ved samme retensjonstid. Metoden ble dermed forlenget til en analysetid på 23 minutter. Overgangen mellom 95 - 0 % mobilfase A ble forlenget med fire steg. Den modifiserte gradienten testet er gitt i Tabell 4-6

Tabell 4-6 Gradient for midlertidig metode under metodeutviklingen.

Minutter	% mobilfase A
0 - 0,25	95
0,25 - 4	95 - 80
4 - 7,5	80 - 60
7,5 - 10	60 - 35
10 - 13	35 - 15
13 - 15	15 - 0
15 - 18	0
18 - 20	0 - 95
20 - 23	95

Ved denne metoden klarte ikke kolonnen å rekondisjonere seg fullstendig etter gjennomført analyseprogram. Dette medførte at alle legemidlene eluerte ut samtidig når to prøver ble kjørt direkte etter hverandre. Ved å forlenge det siste steget med ytterligere 3 minutter, det vil si en totaltid på 26 minutter, ble dette problemet unngått. Den ferdige HPLC-metoden er gitt som metode 1 i Tabell 3-3. Ved endelig metode er kromatogrammet for de 15 legemidlene illustrert i Figur 4-2.

Sent i optimaliseringen ble det oppdaget at acetylsalisylsyre ikke retarderte på kolonnen, og at stoffet eluerte ut i dødvolumet etter ca. 1,5 minutter. Dette medførte at legemiddelet eluerte ut sammen med kontaminanter fra prøven og mobilfasen. Arealet som ble oppnådd for acetylsalisylsyre korrelerte dermed ikke med den mengden acetylsalisylsyre som ble tilsatt i prøven. Acetylsalisylsyre sine resultater kunne derfor ikke benyttes under videre optimalisering. Legemiddelets målte areal er likevel oppgitt.



Figur 4-2 Kromatogrammet for de 15 legemidlene og sulfadoxin ved endelig HPLC-MS/MS metode.

Videre ble det testet om metoden kunne forkortes ved å øke mobilfasegjennomstrømningshastigheten. De ulike metodene som ble testet er illustrert i Tabell 3-3.

Gjennomsnittlig areal for legemidlene ved de ulike metodene er illustrert i Tabell A 10, se Vedlegg A. Tabellen viser at arealet til alle analyttene, med unntak for benzylpenicillin og simvastatin, var lavere for metode 2 - 6 med gjennomstrømningshastighet 0,450 mL/min enn for metode 1 med gjennomstrømningshastighet 0,225 mL/min. For amlodipin, ibuprofen, ketoprofen, losartan, prednisolon, sulfadoxin, sulfametoksazol og tetrasyklin var det stor differanse i areal. For ciprofloksacin, koffein, metoprolol, metronidazol, simvastatin, trimetoprim var differansen mindre, men fortsatt signifikant. Simvastatin hadde tilnærmet like store areal ved både metode 1, 4 og 5.

På grunn av den markante nedgangen i areal for flere av forbindelsene, ble det valgt å benytte metode 1 i det videre arbeidet. Dette til tross for at metoden tok betraktelig lengre tid sammenlignet med de andre. Da mange av legemidlene er forventet å finnes i svært lav konsentrasjon i avløpsvann, ble det prioritert å ha en så god sensitivitet som mulig.

Kolonnoevnstemperatur

Som nevnt i avsnitt 3.5 ble det testet kolonnetemperatur mellom 20 - 50 °C. Det ble testet fire injeksjoner ved hver kolonnoevnstemperatur. Dette for å sikre at arealet hadde stabilisert seg etter temperaturendringen. Gjennomsnittlig areal ved de ulike temperaturene for legemidlene

Tabell A 11.

Tabellen gir en indikasjon på at arealet til ciprofloksacin, simvastatin, sulfadoxin, sulfametoksazol, tetrasyklin og trimetoprim synker når kolonneovnstemperaturen øker. Videre gir tabellen en indikasjon på at økende kolonneovnstemperatur fører til økning i areal for koffein og metronidazol. En høy temperatur på 50°C vil imidlertid kunne medføre en degradering av enkelte legemidler. Benzylpenicillin, metoprolol, prednisolon og losartan viste et areal som var relativt uavhengig av kolonneovnstemperaturen. Det ble observert stor variasjon i arealene ved flere temperaturer ved testing for amlodipin, ibuprofen og ketoprofen. Usikkerheten i målingen er imidlertid å anse som så stor, at legemidlene ikke kan vektlegges ved valg av kolonneovnstemperaturen. De ulike kolonneovnstemperaturene førte ikke til nevneverdige endringer i toppenes form. De fleste av legemidlene eluerte likevel ut noe tidligere når temperaturen økte. Da 5 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin viste en trend der en økende kolonneovnstemperatur førte til en nedgang i areal, ble det valgt å gå videre med kolonneovnstemperatur på 20 °C.

Ionekildeparametere

Som nevnt i avsnitt 3.5 ble ionekildeparameterne gasstemperatur og gasshastighet, sheath gasstemperatur og sheath gasshastighet, kapillærspenning, dysespennning og nebulizertrykk optimalisert. De optimaliserte parameterne er gitt i Tabell 4-7. Rådata for optimaliseringen er gitt i Tabell A 12 Vedlegg A. Det ble benyttet standardinnstillinger for gasshastighet og sheath gasshastighet.

Tabell 4-7 De optimaliserte ionekildeparameterne. Ioniseringskilden var ESI (+).

Parameter	Optimal verdi
Gasstemperatur	300 °C
Nebulizertrykk	30 psi
Sheath gasstemperatur	375 °C
Kapillærspenning	5000 V
Dysespenning	0 V

Tabell A 12 i Vedlegg A viser at amlodipin, benzylpenicillin, metronidazol og sulfametoksazol viste lavest areal ved dysespennning på 1000 V. Et tilnærmet like stort areal fremkommer ved dysespennning på 0 V og 500 V. Losartan ga også lavest areal ved 1000 V, men her var arealet ved 500 V høyere enn ved 0 V.

Ciprofloksacin, sulfadoxin og trimetoprim viste høyest areal ved dysespenning på 0 V. Ketoprofen viste imidlertid lavest areal ved denne dysespenningen, og omtrent like stort areal ved dysespenning på 1000 V og på 500 V. Koffein viste høyest areal ved dysespenning på 1000 V. Simvastatin, prednisolon og tetrasyklin viste at arealet ikke ble påvirket av dysespenningen. Den mest egnede dysespenningen varierte for de ulike legemidlene. Da tre av de utvalgte legemidlene viste høyest areal ved dysespenning 0 V, ble dette valgt videre.

De samme tabellene viser at de fleste legemidlene ikke ble påvirket av kapillærspenningen, og differansen i målt areal var svært liten. Simvastatin viste et noe lavere areal ved kapillærspenning på 2500 V sammenlignet med de andre kapillærspenningene som ble testet. Amlodipin viste et høyere areal ved kapillærspenning på 5000 V. Det ble derfor valgt å gå videre med en positiv kapillærspenning på 5000 V.

Amlodipin, ketoprofen, simvastatin, koffein og prednisolon viste alle høyest areal ved nebulizertrykk på 30 psi. Trimetoprim viste høyest areal ved nebulizertrykk på 30 og 40 psi. Sulfametoksazol, tetrasyklin og metronidazol viste et areal relativt uavhengig av nebulizertrykket ved et trykk på ≥ 20 psi. Sulfadoxin, losartan og benzylenicillin viste et areal relativt uavhengig av nebulizertrykk ved et trykk ≥ 30 psi. Ciprofloksacin ga høyest areal ved nebulizertrykk 50 psi. Flest forbindelser viste høyest areal ved 30psi, og dette nebulizertrykket ble derfor valgt i det videre arbeidet.

Amlodipin, ketoprofen, tetrasyklin, benzylpenicillin prednisolon og simvastatin ga høyest areal ved en gasstemperatur på 300 °C. Losartan og metronidazol viste delvis samme trend. Differansen i areal ved de ulike gasstemperaturene var likevel mindre i disse tilfellene. De resterende legemidlene viste et areal uavhengig av gasstemperaturen. Da flere av legemidlene viste høyest areal ved gasstemperatur på 300 °C ble denne valgt videre.

Trimetoprim viste tilnærmet samme areal ved ulik sheath gasstemperatur. Ketoprofen og ciprofloksacin viste et noe høyere areal ved sheath gasstemperatur på 375 °C sammenlignet med de andre temperaturene. Differansen i areal var likevel ikke stor. De resterende legemidlene viste tydelig høyest areal ved sheath gasstemperatur på 375 °C, og det ble derfor valgt å gå videre med denne temperaturen.

4.1.4 QuEChERS optimalisering

Som nevnt i avsnitt 3.6 ble det optimalisert flere parametere i QuEChERS metoden. På grunn av mulig variasjon i instrumentrespons for de forskjellige dagene, ble det kun sammenlignet oppnådde resultater fra samme dag.

Den første testen ble utført etter den originale QuEChERS metoden til Anastassiades *et al.* (2003), der 6 paralleller ble analysert. Første delprøve ble tatt før dSPE, den neste etter dSPE uten forsuring av ekstraktet, og den siste delprøven ble tatt etter dSPE og etter forsuring av ekstraktet. Som nevnt under avsnittet om ekstraksjonssalt, ga verken ciprofloksacin eller trimetoprim tydelige resultater forskjellig fra 0 under denne testen. Med tydelig forskjellig fra 0 menes en topp tydelig høyere enn støyen. Ingen av legemidlene viste negativ respons av forsuring av ekstraktet etter dSPE, og flere av legemidlene viste et noe lavere areal i de ikke-forsurede ekstraktene. På grunn av dette ble det videre valgt å ta en delprøve før dSPE, kalt S-prøven, og en ny delprøve etter dSPE og forsuring av ekstraktet, kalt M-prøven.

Buffer- og tørkesalt

Som nevnt i avsnitt 3.6 ble ekstraksjonssalt, inkludert tørkesalt og buffersalt, optimalisert. De testede tørkesaltene var $MgSO_4$, og Na_2SO_4 . Både ubufret metode, EN-metoden og AOAC metoden ble testet. For mer informasjon om disse, se avsnitt 2.2 og 3.6. Videre ble det testet å tilsette 0,1 g/mL Na_2EDTA i tillegg til de andre saltene i EN-metoden.

$MgSO_4$ som tørkesalt

Tabell A 13, se Vedlegg A, viser gjennomsnittlig areal for de tre nevnte QuEChERS metodene ved bruk av $MgSO_4$ som tørkesalt. Koffein, benzylpenicillin, prednisolon, sulfametoksazol, simvastatin og trimetoprim viste alle areal relativt uavhengig av hvilket buffersalt som ble valgt. Ibuprofen, ketoprofen og losartan sine S-prøver viser også relativt uavhengig areal. Imidlertid er arealet for M-prøvene ved ubufret metode lavere enn arealet til M-prøvene ved EN-metoden og AOAC-metoden.

Amlodipin var det eneste legemiddelet som viste høyest areal ved AOAC metoden. Metronidazol viste imidlertid lavest areal ved nevnte metode. Sulfadoxin ga høyest areal ved EN-metoden. Arealet til tetrasyklin var kun målbart ved EN-metoden og AOAC-metoden, og

arealet var relativt likt ved de to metodene. Arealet til ciprofloksacin var kun målbart ved EN-metoden. Kun S-prøvene til tetrasyklin og ciprofloksacin ga målbare areal. Da det kun var mulig å detektere ciprofloksacin ved EN-metoden, ble denne metoden valgt ved videre testing.

Na₂SO₄ som tørkesalt

Tabell A 14, se Vedlegg A, viser gjennomsnittlig areal for de tre ulike QuEChERS metodene ved bruk av Na₂SO₄ som tørkesalt. Amlodipin viste også med Na₂SO₄ som tørkesalt høyest areal ved AOAC-metoden. Tetrasyklin og ciprofloksacin kunne detekteres ved alle metodene. Fluorokinoloner og tetrasykliner har evnen til å chelatere med di- og trivalente metallioner, i dette tilfellet Mg²⁺ fra tørkesaltet (Attwood & Florence 2012; Bourdat-Deschamps *et al.* 2014; Uivarosi 2013; Washington 1991). Dette skjer ikke ved bruk av Na₂SO₄ som tørkesalt, og dette tørkesaltet ble derfor ansett som mer egnet.

Arealet til tetrasyklin var høyest ved EN-metoden, men var tilnærmet like stort ved AOAC-metoden og ubufret-metode. Ciprofloksacin, ibuprofen, ketoprofen, metronidazol, sulfadoxin og sulfametoksazol viste lavest areal ved AOAC-metoden. Metronidazol viste samme trend ved bruk av MgSO₄ som tørkesalt, se Tabell A 13 Vedlegg A. Ciprofloksacin og metronidazol viste et noe høyere areal ved EN-metoden sammenlignet med ubufret metode. De fire andre legemidlene viste samme resultat uavhengig av dette. Arealet til koffein, benzylpenicillin, losartan, prednisolon, simvastatin og trimetoprim var relativt uavhengig av buffermetode.

Det lave arealet for ciprofloksacin ved AOAC metoden stemmer med resultatene observert av Zhao og Stevens (2010). Det er imidlertid ikke funnet noen artikler som støtter funnet av det lave arealet for sulfadoxin, sulfametoksazol, ketoprofen, ibuprofen og metronidazol. I en studie utført av Kibechu og Sichilongo (2012) viste imidlertid metronidazol en lavere gjenfinning ved EN-metoden enn ved AOAC-metoden. Núñez *et al.* (2015) sin studie viste at ibuprofen og ketoprofen ga tilnærmet lik gjenfinning ved EN metoden og AOAC metoden. Bragança *et al.* (2012) viste lavere gjenfinning for ibuprofen ved AOAC metoden sammenlignet med EN metoden. I deres studie ga likevel ubufret metode høyest gjenfinning.

På grunn av de lave arealene for flere av legemidlene ved AOAC metoden, ble denne valgt bort. Det ble ikke funnet noen tydelig indikasjon på hvilken metode som var best egnet av EN-metoden og ubufret metode. Det ble derfor valgt å teste begge disse metodene videre.

Tilsetning av 0,1 g/mL Na₂EDTA til EN-metoden

Tabell A 15, se Vedlegg A, viser gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin. Det ble testet 6 paralleller med buffersaltene fra EN-metoden tilsatt Na₂EDTA, med MgSO₄ som tørkesalt, og 5 paralleller med Na₂SO₄ som tørkesalt. Da fluorokinoloner og tetrasykliner har en evne til å chelitere med di- og trivalente metallioner, ble det valgt å teste tilsetning av liganden Na₂EDTA. EDTA har en høyere affinitet for kationer enn tetrasykliner og fluorokinoloner, og vil derfor binde med metallionene. Dette vil være med på å frigjøre tetrasyklin og ciprofloksacin fra kompleksene (Anderson *et al.* 2005; Lopes *et al.* 2012; Peysson & Vulliet 2013; Uslu *et al.* 2008).

Ciprofloksacin og tetrasyklin ga kun målbare M-prøve verdier når Na₂SO₄ var benyttet som tørkesalt. Dette viser at tilsetningen av Na₂EDTA ikke hadde sterk nok effekt til å hindre chelateringen mellom de to legemidlene og overskuddet av tilsatt Mg²⁺. Effekten kunne kanskje ha vært en annen ved bruk av større mengder Na₂EDTA, men dette ble ikke testet videre.

Endelig optimalisering av buffer- og tørkesalt.

Til slutt ble EN-metoden og EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA testet med både MgSO₄ og Na₂SO₄ som tørkesalt. Ubufret metode ble også testet ved bruk av Na₂SO₄ som tørkesalt. Tabell A 16 viser gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin. Den ene M-prøven ved EN-metoden og med Na₂SO₄ som tørkesalt var en tydelig uteligger, der arealet for alle legemidlene lå langt fra arealet for den andre parallellen. Avhengig av type legemiddel var arealet tydelig høyere eller lavere enn forventet. Prøven ble derfor valgt bort videre. Videre viste den ene S-prøven til amlodipin, opparbeidet ved ubufret metode og med Na₂SO₄ som tørkesalt et areal på < 5 % av arealet til den parallelle prøven. Dette resultatet er også en tydelig uteligger, og er derfor valgt bort videre. Rådata er gitt i Tabell A 17.

Verken ciprofloksacin eller tetrasyklin ga målbare verdier for M-prøvene opparbeidet med MgSO₄ som tørkesalt. Dette stemmer med de resultatene som tidligere er observert og

diskutert. MgSO_4 som tørkesalt ble derfor valgt vekk. S-prøvene til tetrasyklin og ciprofloksacin ga lavest areal ved ubufret metode. For de resterende S-prøvene, samt alle M-prøvene opparbeidet med Na_2SO_4 som tørkesalt, var arealet uavhengig.

Arealet til amlodipin, prednisolon og trimetoprim var uavhengig av valgt metode og tørkesalt. For amlodipin stemmer ikke dette i forhold til resultatene fra Tabell A 15, der responsen var høyest med Na_2SO_4 som tørkesalt. Ibuprofen, ketoprofen, losartan, benzylpenicillin, sulfametoksazol og sulfadoxin viste alle M-prøver med høyere areal med Na_2SO_4 som tørkesalt, sammenlignet med MgSO_4 . Videre viste M-prøvene for samtlige legemidler høyere areal ved ubufret metode.

Simvastatin viste et areal uavhengig av tørkesaltet. Dette stemmer heller ikke med resultatene observert i Tabell A 15, der legemiddelet viste høyere areal med Na_2SO_4 som tørkesalt. Ved bruk av Na_2SO_4 som tørkesalt viste legemiddelet lavere areal for M-prøvene ved EN-metoden og ved EN-metoden tilsatt Na_2EDTA . Koffein viste et varierende areal, uten tydelig indikasjon på hvilken metode som var mest egnet.

Metronidazol ga høyere areal for S-prøvene opparbeidet med MgSO_4 som tørkesalt. Dette i motsetning til responsen observert i Tabell A 15, der arealet var uavhengig av type tørkesalt. Arealet var imidlertid relativt uavhengig av type buffermetode. S-prøven opparbeidet ved ubufret metode og med Na_2SO_4 som buffersalt, viste likevel noe lavere areal sammenlignet med resten.

Ingen av resultater ga entydig indikasjon på at pH-justering med EN-metoden ga noen fordeler fremfor ubufret metode, så fremt Na_2SO_4 ble benyttet som tørkesalt. For flere av legemidlene ga testene ulike indikasjoner på hvilken metode som gir høyest areal. Videre var differansen i areal ofte svært liten, og standardavvikene var relativt store. Det var forventet at avløpsvannmatriksen kunne inneholde divalente og trivalente metallioner. Videre var det forventet at pH-en i avløpsvannet kunne påvirket ekstraksjonen slik at en pH-justering ville være nødvendig. Det ble derfor valgt å videre teste både ubufret metode, EN-metoden og EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA i matriksprøver. Alle med Na_2SO_4 som tørkesalt.

Ekstraksjonsmiddel

Som nevnt i avsnitt 3.6 ble ekstraksjonsmiddelet som ble benyttet under QuEChERS ekstraksjonen optimalisert. Først ble 3 paralleller med ACN testet mot 6 paralleller av MeOH. Det ble opparbeidet færre paralleller med ACN som ekstraksjonsmiddel, da dette middelet hadde vist relativt stabilt areal under optimaliseringen av buffersaltene, se Tabell A 13 - Tabell A 16, Vedlegg A. Gjennomsnittlig areal for parallellene er gitt i Tabell A 18

ACN ga et høyere areal for amlodipin, ibuprofen, ketoprofen, koffein, losartan, prednisolon, simvastatin, sulfadoxin, sulfametoksazol og trimetoprim. MeOH som ekstraksjonsmiddel ga derimot høyere areal for benzylpenicillin, metronidazol og tetrasyklin. Ciprofloksacin var relativt stabil uavhengig av type ekstraksjonsmiddel, men M-prøvene med ACN som ekstraksjonsmiddel ga lavere areal enn for de resterende ekstraktene. ACN som ekstraksjonsmiddel ga en høyere respons for mange av legemidlene, og det ble derfor valgt å benytte dette under videre testing.

Videre ble det testet 4 paralleller med ren ACN, ACN tilsatt 1 % V/V maursyre og ACN tilsatt 1 % V/V eddiksyre. Gjennomsnittlig areal for parallellene er gitt i Tabell A 19. Koffein, prednisolon og trimetoprim viste tilnærmet samme areal ved alle de tre ekstraksjonsmiddelkombinasjonene, og en forsuring av ACN ga ingen fordel ved ekstraksjonen. Sulfametoksazol, sulfadoxin, ibuprofen og ketoprofen viste også et areal relativt uavhengig av ekstraksjonsmiddelet. M-prøven, oppnådd med ren ACN som ekstraksjonsmiddel, viste imidlertid et lavere areal enn for de andre M-prøvene. For sulfametoksazol og ibuprofen var differansen i areal mindre enn for ketoprofen og sulfadoxin.

Metronidazol og simvastatin hadde tilnærmet samme areal ved bruk av ren ACN og ACN med 1 % V/V eddiksyre som ekstraksjonsmiddel. Ved bruk av ACN med 1 % V/V maursyre som ekstraksjonsmiddel, ble imidlertid arealet noe lavere. Årsaken til dette er ukjent.

Benzylpenicillin viste noe varierende areal, men S-prøven opparbeidet med ren ACN ga gjennomsnittlig høyest respons. RSD var imidlertid svært høyt.

Amlodipin og losartan viste begge høyest areal for ACN med 1 % V/V eddiksyre og for S-prøven med ren ACN. Videre viste amlodipin likt areal for ACN med 1 % V/V maursyre og

for M-prøven med ren ACN. Losartan viste lavest areal for M-prøven til ren ACN. Differansen i areal var relativt liten i begge tilfellene.

Både tetrasyklin og ciprofloksacin viste tydelig lavest areal ved bruk av ren ACN som ekstraksjonsmiddel. Spesielt M-prøvene opparbeidet med ren ACN som ekstraksjonsmiddel, ga en tydelig lavere respons enn de andre prøvene. Forsuringen av acetonitril presser syredissosiasjonslikevekten til legemidlene over mot protonert nøytral form, og denne formen fordeles bedre inn i ACN-fasen. Videre øker ekstraksjonseffektiviteten (Koesukwiwat *et al.* 2008; Schneider *et al.* 2003; Zhao & Stevens 2010).

De lave arealene ved M-prøvene til tetrasyklin, ciprofloksacin, ibuprofen, ketoprofen, sulfametoksazol og sulfadoxin, der ren ACN brukes som ekstraksjonsmiddel, indikerer at disse legemidlene til en viss grad interagerer med PSA. Zhao og Stevens (2010) forteller at syre interagerer med PSA når syren tilsettes ACN. Dette medfører at interaksjonene mellom PSA og analyttene reduseres. Den høyere responsen for M-prøvene med forsuret ACN bekrefter dermed dette. Syrens interaksjon med PSA, medfører imidlertid at PSA sin evne til å interagere med fettsyrer og andre organiske syrer reduseres. Dette påvirker PSA sin opprensningseffekt i negativ retning (Anastassiades *et al.* 2003). Til tross for dette ble det valgt å jobbe videre med forsuret ACN som ekstraksjonsmiddel. Dette fordi dette ga en betydelig bedre ekstraksjon av tetrasyklin og ciprofloksacin. I tillegg var det til hjelp under opprensningssteget for flere av legemidlene. Da ACN med 1 % V/V maursyre hadde vist en uheldig effekt på ekstraksjonen av simvastatin og metronidazol, ble det valgt å gå videre med ACN med 1 % V/V eddiksyre.

Ekstraksjonstid

Som nevnt i avsnitt 3.6 ble det testet en ekstraksjonstid på 1, 5 og 10 minutter. Videre ble det undersøkt 4 paralleller per ekstraksjonstid. En ekstraksjonstid på 1 minutt vil si ingen videre ekstraksjonstid utover ristetiden på 1 minutt etter tilsetning av hver komponent. Tabell A 20 viser gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ulike ekstraksjonstid. Tabellen viser at ekstraksjonseffekten, målt i areal, er relativt uavhengig av ekstraksjonstiden. Lenger ekstraksjonstid, og mer reaksjonstid etter tilsetning av de ulike sorbentene og saltene, ser ikke ut til å ha noen effekt på legemidlenes fordeling inn i den organiske fasen. Losartan, prednisolon og sulfadoxin viser likevel en indikasjon mot høyere areal ved 5 minutters ekstraksjonstid sammenlignet med 1 og 10 minutter. Da det kun ble observert et høyere areal ved 5 minutters ekstraksjonstid, og heller ingen videre økning eller like stort areal ved 10 minutter ekstraksjonstid, kan det ikke nødvendigvis konkluderes med at 5 minutters ekstraksjonstid gir en bedre ekstraksjon. Det ble heller ikke observert noen tydelig korrelasjon mellom ekstraksjonstid og RSD. For å spare tid ble det derfor valgt å gå videre med ekstraksjonstid 1 minutt.

Sentrifugeringstid og hastighet

Da ulike forfattere benytter ulike sentrifugeringstider og hastigheter, ble det valgt å teste hvilken påvirkning dette hadde (Anastassiades *et al.* 2003; Bourdat-Deschamps *et al.* 2014; Cerqueira *et al.* 2014; Lehotay *et al.* 2005a; Lehotay *et al.* 2005b; Lopes *et al.* 2012). Hastighetene som ble testet var 1500 rpm, 3000 rpm og 4500 rpm, der dette tilsvarte 377, 1509 og 3 396g på sentrifugen som ble benyttet under ekstraksjonssteget, og 100, 600 og 1800g på mikrosentrifugen som ble benyttet ved dSPE, se Tabell 3-4. Sentrifugeringstidene var 5, 10 og 15 minutter. Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene og sulfadoxin er gitt i Tabell A 21 og Tabell A 22.

Tabell A 21 viser at sentrifugeringstiden påvirket opprensningseffekten i ubetydelig grad. Det er en svak trend for flere av legemidlene, som kan indikere at 15 minutters sentrifugeringstid gir et lavere standardavvik. Differansen i standardavvik var imidlertid svært lav. Da det kun var kjørt 4 paralleller, var ikke differansen i standardavvik stort nok til at dette kunne anses som relevant. Det ble derfor konkludert med at 5 minutters sentrifugering var tilstrekkelig.

Tabell A 22 viser at sentrifugeringshastigheten hadde liten effekt på arealet til de ulike legemidlene. Simvastatin var det eneste legemiddelet som ble påvirket av sentrifugeringshastigheten, og legemiddelets areal var høyere ved 1500 rpm enn ved de to andre hastighetene. Tabell A 22 viser at sentrifugeringshastigheten heller ikke påvirket standardavviket i særlig grad. Det ble imidlertid observert at M-prøvene til tetrasyklin hadde et svært stort standardavvik, både ved 1500 rpm og 4500 rpm, og RSD var henholdsvis 58,2 % og 61,1 %. Ved 3000 rpm var RSD kun 16,4 %. Årsaken til dette er ukjent. Til tross for den effekten sentrifugeringshastigheten hadde for simvastatin ble det valgt å gå videre med sentrifugeringstid 3000 rpm, tilsvarende 1509 g ved sentrifugen som ble benyttet ved ekstraksjonen, og 600 g på mikrosentrifugen som ble benyttet ved dSPE.

dSPE og videre opprensning

Som nevnt i avsnitt 3.6 ble det testet ulike mengder PSA i dSPE-steget. Videre ble det testet muligheten for å erstatte dSPE-steget med en *n*-heksanopprensning. 6 paralleller ble testet for hver mengde PSA. Først ble det testet 25 mg PSA/mL og 12,5 mg PSA/mL. For 12,5 mg PSA/mL ble den ene parallellen ødelagt, og kun 5 paralleller ble derfor analysert. Gjennomsnittlig areal er gitt i Tabell A 23.

25 mg PSA/mL ga høyere areal for amlodipin, benzylpenicillin, ibuprofen, ketoprofen, koffein, losartan, metronidazol, prednisolon, simvastatin, sulfadoxin, sulfametoksazol og trimetoprim. Ciprofloksacin og tetrasyklin ble ikke påvirket av mengden PSA. Testene ble utført med rene standardblandinger, noe som medførte begrensede matrikskomponenter. Det var derfor ikke mulig å vurdere opprensningseffekten ved bruk av PSA. På grunn av tidsproblemer ble ikke denne optimaliseringen utført i matriks. Som nevnt i avsnitt 2.2, vil analytter som inneholder syregrupper kunne interagere med aminosorbenter. Ved testing av økende mengde PSA vil dette kunne vise eventuelle interaksjoner mellom legemidlene og sorbenten.

Resultater indikerte sterkt at lavere konsentrasjon enn 25 mg PSA/mL ikke var tilstrekkelig for videre opprensning. Det svært høye standardavviket til parallellene ved 12,5 mg PSA/mL tyder på at det har oppstått feil under prøveopparbeidelsen. Dette understøttes også av det faktum at arealet målt i delprøvene tatt før dSPE, var lavere for 12,5 mg PSA/mL enn for 25 mg PSA/mL. Det ble derfor valgt å teste videre med begge disse konsentrasjonene PSA.

37,5 mg PSA/mL ble testet mot opprensning ved bruk av *n*-heksan, der selve dSPE-steget ble utelukket. Dette etter fremgangsmåten til (Lazartigues *et al.* 2011). *n*-heksanopprensningen ble testet, da den skal kunne benyttes til å fjerne lipider i matriks. Ved en *n*-heksan opprensning tilsettes *n*-heksan før tilsetning av buffer- og tørkesalt. Etter første sentrifugeringstrinn vil da deler av lipidene i prøven befinne seg i den øvre *n*-heksanfasen. Gjennomsnittlig areal er gitt i Tabell A 24. Amlodipin, ciprofloksacin, ibuprofen, ketoprofen, koffein, losartan, metronidazol, prednisolon, simvastatin, sulfadoxin, sulfametoksazol, tetrasyklin og trimetoprim ga høyere areal ved dSPE-opprensning sammenlignet med *n*-heksanopprensning. Arealet for benzylpenicillin var tilnærmet likt ved de to opprensningsmetodene. Det lave arealet for de fleste legemidlene ved *n*-heksanopprensning

kan indikere at *n*-heksantilsetningen gir en ionesuppresjonseffekt. Alternativt kan *n*-heksantilsetningen ha gitt en dårligere ekstraksjon av legemidlene over i ACN-fasen. Nøyaktig årsak til det lave arealet ble ikke undersøkt videre. Det ble valgt å gå videre med dSPE istedenfor *n*-heksanopprensning.

50 mg PSA/mL ble deretter sammenlignet med 75 mg PSA/mL. Gjennomsnittlig areal er gitt i Tabell A 25. En av prøvene skilte seg ut som en uteligger for benzylpenicillin, der den ene S-prøven viste et areal på omtrent 6 % av arealet til de resterende S-prøvene. Denne prøven ble derfor valgt bort. Rådata er gitt i Tabell A 26. Amlodipin, ibuprofen, koffein, prednisolon, simvastatin, sulfametoksazol og trimetoprim gir tilnærmet samme resultat ved 50 mg og 75 mg PSA/mL. Videre ga losartan, metronidazol og sulfadoxin sine M-prøver samme resultat både ved 50 mg og 75 mg PSA/mL. Arealet for S-prøvene var imidlertid høyere ved 75 mg PSA/mL. Dette kan indikere at det har forekommet en nedgang i areal. Benzylpenicillin, ciprofloksacin, ketoprofen og tetrasyklin sine M-prøver hadde noe høyere areal når det ble benyttet 50 mg PSA/mL sammenlignet med 75 mg PSA/mL. Nedgangen i respons ved 75 mg PSA/mL kan indikere at noen av legemidlene til en viss grad har interagert med de høye mengdene PSA. Nedgangen var imidlertid ikke spesielt stor. Det ble likevel valgt å benytte 50 mg PSA/mL i videre testing.

Deretter ble 12,5 mg, 25 mg, 37,5 mg og 50 mg PSA/mL sammenlignet med hverandre. 3 paralleller ble testet per PSA-konsentrasjon. Gjennomsnittlig areal er gitt i Tabell A 27. Benzylpenicillin, ciprofloksacin, ketoprofen, sulfadoxin, viste et tilnærmet likt areal ved 12,5 mg og 25 mg PSA/mL. Arealet ved 37,5 mg og 50 mg PSA/mL var imidlertid noe lavere. Disse analyttene viste samme trend når 50 mg og 75 mg PSA/mL ble sammenlignet med hverandre. Videre viste sulfadoxin, ketoprofen og ciprofloksacin samme trend ved sammenligning av de ulike ekstraksjonsmidlene. Dette indikerer at legemidlene til en viss grad interagerer med PSA ved økende PSA-mengde.

Det er tidligere skrevet om ekstraksjonsmiddeloptimalisering, se avsnitt 4.1.4. Det ble observert en mulig interaksjon mellom PSA og ibuprofen og sulfametoksazol. Differansen i areal mellom M-prøvene med ren ACN og forsuret ACN, var imidlertid ikke spesielt høy. Dette indikerer at interaksjonene med PSA var mindre sammenlignet med interaksjonene mellom PSA og de andre legemidlene. Det at det ikke er observert noen differanse i arealet

ved økende mengde PSA for disse legemidlene, betyr ikke nødvendigvis at det ikke forekommer noen interaksjon med PSA.

Tetrasyklin sitt areal var svært varierende, og vil derfor ikke diskuteres videre. Amlodipin, ibuprofen, koffein, losartan, metronidazol, prednisolon, simvastatin sulfametoksazol og trimetoprim, viste et areal uavhengig av PSA mengden. Variasjonen i respons var liten i alle tilfellene, men på grunn av den observerte interaksjonen med PSA for noen av legemidlene ble det valgt å gå videre med «standard-mengden» benyttet i den opprinnelige QuEChERS metoden av Anastassiades *et al.* (2003), det vil si 25 mg PSA/mL. Det var likevel ikke mulig å konkludere med om denne PSA-mengden var tilstrekkelig for arbeid med matriks.

QuEChERS optimalisering for metoprolol

Så snart problemene med metoprolol ble ordnet, se avsnitt 3.5, ble flere av de ulike QuEChERS parametere testet for legemiddelet, se avsnitt 3.6. 3 paralleller ble testet per metode, og metodene som ble testet var:

- $MgSO_4$ som tørkesalt
 - o EN-metoden
- Na_2SO_4 som tørkesalt
 - o Ubufret metode
 - o EN-metoden
 - o EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA
 - o EN-metoden med ACN med 1 % V/V eddiksyre som ekstraksjonsmiddel

Gjennomsnittlig areal er gitt i Tabell 4-8.

Nevnte tabell viser at Metoprolol sitt areal var relativt uavhengig av både tørkesalt og buffersalt. Arealet med ACN med 1 % V/V eddiksyre var noe lavere enn arealet oppnådd med ren ACN. Differansen var likevel ikke stor nok til at det ble konkludert med å endre på de tidligere avgjørelsene tatt under QuEChERS optimaliseringen.

Tabell 4-8 Gjennomsnittlig areal for Metoprolol en forenklet QuEChERS optimalisering. S-prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE.

Tørkesalt, buffersalt		Metoprolol [3]
$MgSO_4$, EN-metoden	S-prøve	263 981 \pm 4,9 %
	M-prøve	253 417 \pm 0,6 %
Na_2SO_4 , ubufret	S-prøve	259 238 \pm 4,9 %
	M-prøve	247 748 \pm 1,0 %
Na_2SO_4 , EN-metoden	S-prøve	258 812 \pm 1,6 %
	M-prøve	254 154 \pm 6,6 %
Na_2SO_4 , EN-metoden med Na_2EDTA	S-prøve	273 343 \pm 5,5 %
	M-prøve	262 783 \pm 10,9 %
Na_2SO_4 , EN-metoden, med 1 % V/V eddiksyre i ACN	S-prøve	248 600 \pm 1,3 %
	M-prøve	228 723 \pm 7,7 %

4.1.5 Neddampingstester

Som nevnt i avsnitt 3.7 ble neddampingstester utført både med trykkluft og nitrogen. Dette for å sjekke eventuelle ulike effekter de to neddampingsmetodene hadde på legemidlene. Det ble studert både rene neddampede ekstrakter rekonstituert i vann, og neddampede ekstrakter som deretter gjennomgikk en QuEChERS ekstraksjon. Gjennomsnittlig prosentvis gjenfinning er gitt i Tabell A 28, Vedlegg A. Gjenfinning er ikke beregnet for acetylsalisylsyre. Standardblandingen, som senere skulle benyttes til å beregne gjenfinning ble ved en feil fortynnet til en for lav konsentrasjon den dagen da neddamping med trykkluft skulle testes. Arealet er derfor estimert ved hjelp av faktoren mellom konsentrasjon i standardløsningen, og konsentrasjon i de neddampede standardene

For de fleste legemidlene ble det ikke observert noen stor differanse i gjenfinning ved de to neddampingsmetodene, og begge metodene var å anse som like godt egnet. Gjenfinningen varierte noe mellom de to metodene, eksempelvis lå prosentvis gjenfinning mellom 68 - 99 % for neddamping med nitrogen for ciprofloksacin, mens gjenfinningen var mellom 82 - 104 % med trykkluft. For de fleste legemidlene var imidlertid gjenfinningen i samme størrelsesområde. Benzylpenicillin og tetrasyklin var unntaket. Benzylpenicillin viste en gjenfinning på flere 1 000 % ved bruk av nitrogen under neddampingen, og tetrasyklin viste en gjenfinning på flere 1 000 % ved bruk av trykkluft under neddampingen. Årsak til disse resultatene er imidlertid ukjent. For flere av legemidlene kan det observeres en gjenvinning over 100 %. Dette skyldes trolig en systematisk feil under rekonstituering med vann, der det ble benyttet for lite vann. Dette indikerer også at de legemidlene som viste en gjenfinning nærmere 100 % kan ha gått tapt under neddampingsprosessen. Da begge neddampingsmetodene var å anse som like egnet, ble det valgt gå videre med neddamping med trykkluft. Dette fordi utstyret for denne neddampingsmetoden var lettest tilgjengelig.

De fleste legemidlene viste ingen påvirkning på om DMSO ble tilsatt før neddampingen. Amlodipin viste likevel en effekt av dette, og ekstraktene uten tilsatt DMSO viste en lavere prosentvis gjenfinning. For ibuprofen ble det observert en svært varierende gjenfinning i prøvene uten DMSO. Dette når trykkluft ble benyttet til neddampingen. I de prøvene som ble tilsatt DMSO var derimot den prosentvise gjenfinningen tett opp mot den oppnådde gjenfinningen ved bruk av nitrogen. De prøvene som gjennomgikk en QuEChERS ekstraksjon, indikerer at trimetoprim hadde en fordel ved tilsetning av DMSO før

neddampingen. Dette både ved bruk av nitrogen og trykkluft. I det videre arbeidet ble det derfor valgt å tilsette 50 μL DMSO til prøvene før neddamping ble foretatt.

4.1.6 Metodetest i matriksprøver

Som nevnt i avsnitt 3.8, ble det utført en metodetest med utløpsvann fra VEAS. Målet var å avdekke hvilken metode som var mest egnet for bruk med avløpsvann; ubufret metode, EN-metoden eller EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA . Før neddamping og påfølgende QuEChERS ekstraksjon, ble hvert ekstrakt fordelt på 3 delprøver etter utført HLB-ekstraksjon. Dette slik at eventuelle variasjoner i HLB-kolonnene og SPE-prosessen ikke skulle påvirke resultatet under optimaliseringen av QuEChERS ekstraksjonen. 3 av vannprøvene ble spiket med de 15 legemidlene, 3 internstandarder samt sulfadoxin, og 1 av vannprøvene ble spiket med internstandardene. De 2 siste vannprøvene ble ikke tilsatt noen standard. Rådata for målingene er gitt i Tabell A 29, se Vedlegg A. M-prøven til den ene ikke-spikede prøven ekstrahert ved ubufret QuEChERS metode, viste for alle legemidlene langt høyere areal sammenlignet med de resterende ikke-spikede prøvene. Differansen i areal var så stor at det kunne mistenkes at feil prøve var blitt målt. Prøven ble derfor valgt bort i det videre arbeidet.

Tabell A 29 viser at ciprofloksacin gir et noe høyere areal for alle spikede ekstrakter ved EN-metoden sammenlignet med de to resterende metodene.

For amlodipin viste spiket ekstrakt 1 og 3 et lavere areal ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA i forhold til de to andre metodene. Spiket ekstrakt 2 viste imidlertid en annen trend, da høyest areal ble observert ved EN-metoden, og de to andre metodene ga tilnærmet likt areal. Differansen i areal var imidlertid ikke spesielt stor i noen av tilfellene, og dette kan derfor ha vært et tilfeldig funn.

For benzylpenicillin ga spiket ekstrakt 1 et mye lavere areal ved EN-metoden sammenlignet med de andre metodene. Videre ga EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA et noe lavere areal sammenlignet med ubufret metode. Ved spiket ekstrakt 2 og 3 var arealet for EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na_2EDTA noe lavere enn for de 2 andre metodene.

Ketoprofen viste for de spikede ekstraktene generelt sett et lavere areal for M-prøvene ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA. S-prøvene viste imidlertid tilnærmet like areal. Losartan viste lavest areal ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA i alle spikede ekstrakter. Videre ga spiket ekstrakt 1 og 2 et noe høyere areal ved ubufret metode sammenlignet med EN-metoden. Metoprolol viste relativt likt areal ved alle metodene. Imidlertid ga spiket ekstrakt 3, et noe lavere areal ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA.

Simvastatin viste en generell trend ved de spikede ekstraktene, der arealet var lavest ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA og høyest ved ubufret metode. Sulfametoksazol viste en trend der EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA ga et noe lavere areal i spiket prøve 1 og 3. Differansen i areal var imidlertid relativt liten.

Tetrasyklin viste høyest arealet ved ubufret metode i spiket ekstrakt 1 og 2. I begge disse ekstraktene viste EN-metoden og EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA tilnærmet like stort areal. Spiket ekstrakt 3 viste derimot et noe lavere areal for ubufret metode sammenlignet med de andre metodene. De tre spikede ekstraktene ga ingen tydelig indikasjon på hvilken metode som var best egnet for tetrasyklin.

Koffein, trimetoprim, sulfadoxin og metronidazol viste varierende areal, der de spikede ekstraktene indikerte forskjellige metoder som best egnet. Det ble derfor konkludert med at koffein, trimetoprim, sulfadoxin og metronidazol var relativt uavhengig av valgt metode. Sulfadoxin-D₃ fulgte samme trend som sulfadoxin.

Prednisolon viste tilnærmet samme areal ved de forskjellige metodene. Kun ikke-spiket ekstrakt 2 ga målbart areal blant de ikke-spikede ekstraktene. Arealet var svært varierende, og ble derfor ikke hensynstatt ved valg av metode.

Ibuprofen viste også tilnærmet samme areal uavhengig av metode. Ibuprofen-D₃ viste derimot noe varierende areal, og disse prøvene viste et lavere areal enn forventet:

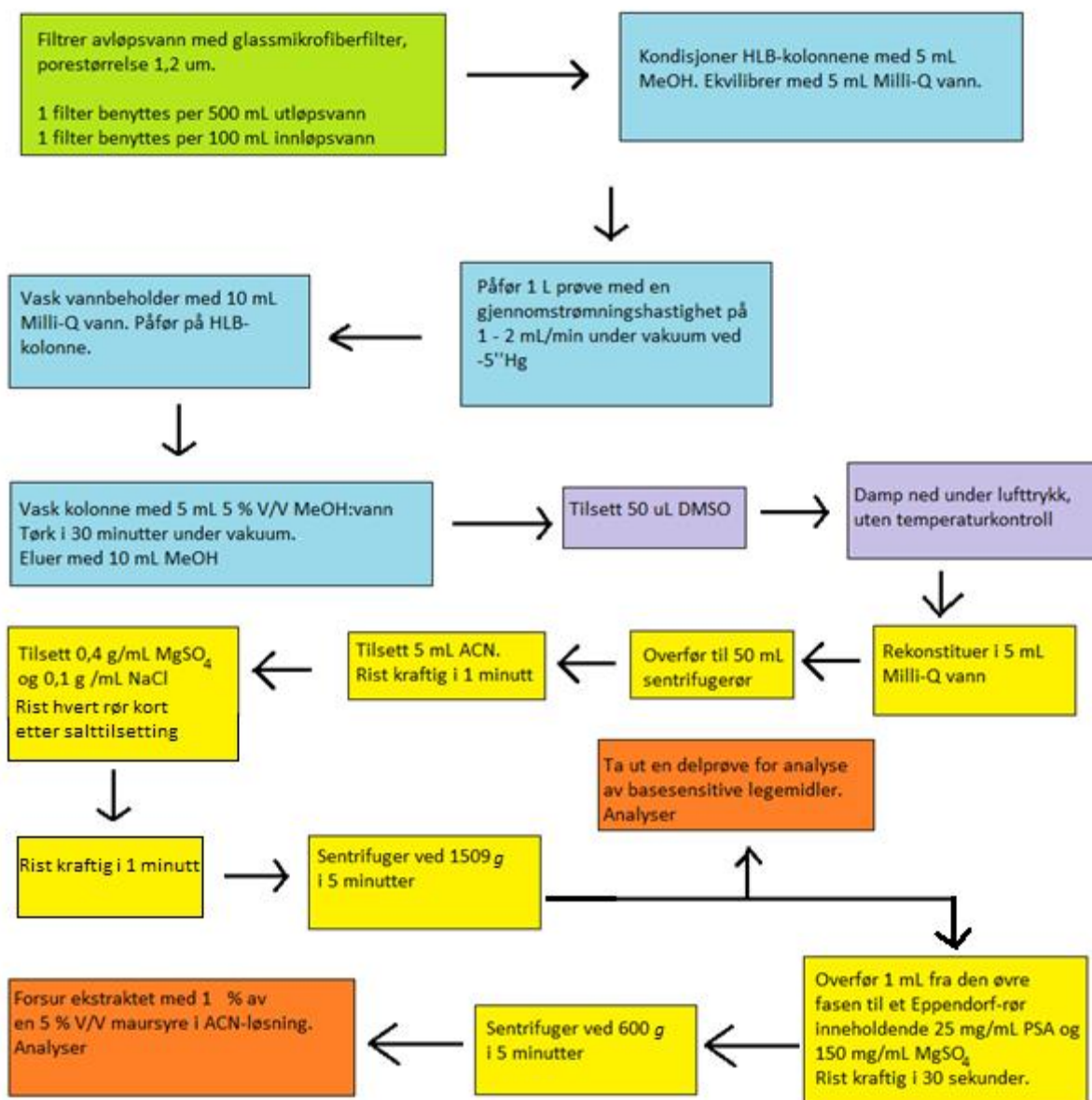
- S-prøve
 - Ubufret metode, spiket ekstrakt 1
 - EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA, ekstrakt spiket med ISTD
- M-prøve
 - Ubuffret metode og EN-metoden, ekstrakt spiket med ISTD

De resterende prøvene ga et areal relativt uavhengig av buffersaltmetode.

De ikke-spikede ekstraktene ga tilnærmet samme areal uavhengig av valg av metode for amlodipin, ciprofloksacin, ibuprofen, ketoprofen, koffein, trimetoprim, metronidazol, metoprolol, sulfadoxin, sulfametoksazol, tetrasyklin og trimetoprim. Losartan sine ekstrakter ga et noe høyere areal for ubufret metode. Differansen i areal er imidlertid så liten at den ikke ble hensyntatt ved valg av metode. Benzylpenicillin og simvastatin ble ikke detektert i de ikke-spikede ekstraktene.

Kort oppsummert ga 7 av legemidlene lavest areal ved EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA, 2 av legemidlene ga høyest areal ved ubufret metode, 1 av legemidlene ga høyere areal ved EN-metoden, og 6 av legemidlene viste tilnærmet likt areal uavhengig av metode. Differansen i areal var imidlertid ikke spesielt stor i noen av tilfellene. Kun simvastatin og losartan ga signifikant lavere areal om EN-metoden tilsatt 1g/mL Na₂EDTA. Ingen av legemidlene viste et areal som tydelig ga indikasjoner på at EN-metoden eller EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA var bedre egnet enn ubufret metode. Det ble derfor valgt å gå videre med ubufret metode, da denne hadde færre steg sammenlignet med de to andre metodene. Ferdig metode er illustrert i Figur 4-3.

I den ferdige metoden oppkonsentreres legemiddelrestene ved SPE med HLB-kolonner før det foretas en QuEChERS ekstraksjon. Det eluerte metanolvolumet dampes ned ved hjelp av trykkluft uten temperaturkontroll, for deretter å rekonstitueres i Milli-Q vann. Dette fordi det var ønskelig å ha legemidlene i en vandig fase før fase-separasjon med ACN. For å justere pHen tilsettes ekstraksjonsmiddelet, ACN med 1 % V/V eddiksyre. Forsuringen medfører en noe dårligere interaksjon mellom PSA og legemidler med syregrupper. Videre medfører forsuringen at syredissosiasjonslikevekten til ciprofloksacin og tetrasyklin presses mot nøytral form, noe som hjelper fordelingen av legemidlene over til ACN-fasen. Under ekstraksjonen benyttes ikke buffersalter for å justere pHen. Na₂SO₄ benyttes som tørkesalt. 25 mg PSA/mL benyttes som sorbent under dSPE-steget.



Figur 4-3 Flytskjema for SPE- opprensning og QuEChERS ekstraksjon av 15 ulike legemidler i avløpsvann.

4.2 Metodevalidering

Som nevnt i avsnitt 3.9 ble det foretatt en forenklet metodevalidering. Det ble opparbeidet en linearitetsrekke over 7 nivåer. Dette inkluderte matriksblind, samt 5 kontrollprøver på to av nivåene fra linearitetsrekken. Disse prøvene skulle benyttes for å studere linearitet, presisjon og nøyaktighet. I tillegg ble R^T , R^{MS} og R^{PO} studert.

Det ble opparbeidet en reagensblind, der 1 L Milli-Q vann ble ført gjennom hele metoden. Ingen av legemidlene ble detektert i reagensblinden. Ved en feil ble det ikke tilsatt internstandard til reagensblinden, og eventuelle feil og avvik ved prøven kan dermed ikke avkrefte med sikkerhet. Under arbeid med innløpsvann, se avsnitt 4.3, ble det analysert en feltblind. Da ingen av de utvalgte legemidlene ble detektert i disse prøvene, skyldes dette mest sannsynlig at reagensene i metoden ikke inneholdt noen forurensninger som kunne interferere med legemiddelanalysen.

Under resultatbearbeidingen ble det oppdaget at flere av de legemidlene som eluerte ut i starten av kromatogrammet, viste en svært stor båndspredning, se Figur 4-2, avsnitt 4.1.3. Under optimalisering av metoden, ble dette problemet unngått ved å integrere et bestemt retensjonstidsområde. Under metodevalideringen ga dette imidlertid stor usikkerhet i forhold til kvantitativ bestemmelse, og disse legemidlene kunne derfor kun kvalitativt detekteres i prøven. Videre var ikke kvaliteten til kromatografien tilfredsstillende. Skanntiden var for lang, noe som ga for få avlesninger per topp. Til tross for usikkerheten dette medførte, ble det valgt å gå videre med disse resultatene. Ved videre arbeid må kromatografien forbedres.

Det ble benyttet tre ulike internstandarder under metodevalideringen; ibuprofen- D_3 , sulfadoxin- D_3 og koffein- $^{13}C_3$. Koffein $^{13}C_3$ ble ikke detektert. Mulig årsak til dette kan være en degradert standard, alternativt feil innstillinger på MSen. I praksis ble derfor kun 2 av internstandardene benyttet. Dette er for få standarder til at de vil være ideelle for alle legemidlene. Flere faktorer ble vurdert ved valg av internstandard. Både likhet i struktur og retensjonstid ble vurdert, i tillegg til hvilken internstandard som ga best linearitet.

Sulfadoxin- D_3 ble å anse som best egnet for de fleste legemidlene. Sulfadoxin og sulfametoksazol viste størst likhet i både struktur og retensjonstid, og begge ga best linearitet ved bruk av sulfadoxin- D_3 som internstandard. Amlodipin, benzylpenicillin, koffein,

metoprolol, metronidazol, prednisolon, tetrasyklin og trimetoprim eluerte alle ut med en retensjonstid nærmere sulfadoxin-D₃ enn med ibuprofen-D₃. Videre viste de samme legemidlene best linearitet når det ble benyttet sulfadoxin-D₃. Denne internstandarden ble derfor valgt for disse legemidlene. Ciprofloksacin ga for S-prøvene best linearitet ved bruk av ibuprofen-D₃. Ved M-prøvene var imidlertid lineariteten langt bedre med sulfadoxin-D₃. Videre eluerte ciprofloksacin ut ca. 2 minutter før sulfadoxin-D₃, og ca. 6 minutter før ibuprofen-D₃. Det ble derfor valgt å gå videre med sulfadoxin-D₃. Losartan eluerte ut midt mellom de to internstandardene. Legemiddelet viste imidlertid en bedre linearitet med sulfadoxin-D₃, og det ble derfor valgt å gå videre med nevnt internstandard.

For ibuprofen, ketoprofen og simvastatin var ibuprofen-D₃ best egnet. For ibuprofen og ketoprofen viste strukturen størst likhet med ibuprofen-D₃, og alle tre de legemidler eluerte ut nærmest ibuprofen-D₃. Ketoprofen viste best linearitet ved bruk av sulfadoxin-D₃ som internstandard. Til tross for dette, ble det valgt å benytte ibuprofen-D₃ for de tre legemidlene.

Sulfadoxin-D₃ ga svært varierende areal for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, varierende mellom 13 767 til 76 130, noe som ga en RSD på 52,4 %. Den samme variasjonen ble ikke observert for de andre legemidlene. Kontrollprøvene ved 600 ng/mL for sulfadoxin, viste eksempelvis en variasjon mellom 149 028 - 199 983, noe som ga en RSD på 11,1 %. Dette tyder på at det har forekommet en tilfeldig feil ved tilsetning av internstandarden til kontrollprøvene. Internstandardens areal viste en lavere RSD, 29,8 %, for de resterende prøvene i linearitetsrekken. Variasjonen kan der skyldes usikkerheter i metodeopparbeidelsen. På grunn av dette ble det valgt å ikke benytte seg av internstandarden under metodevalideringen.

Ibuprofen-D₃ viste et langt mer stabilt areal i kontrollprøvene ved 600 ng/mL, med en RSD på 12,3 %. For de andre prøvene i linearitetsrekken var imidlertid variasjonen større, med en RSD på 24,3 %. Egnetheten for ibuprofen-D₃ som internstandard er vurdert i avsnittet for ibuprofen.

Metodevalideringsparametere

Som nevnt i avsnitt 3.9, ble metodevalideringen utført over to dager. Dette på grunn av for få adaptere. Hver dag ble det opparbeidet en fullstendig linearitetsrekke i tillegg til 5 kontrollprøver over et nivå. Verdiene for linearitetsrekkene var tilnærmet like, og det er derfor kun oppgitt verdiene fra én av dagene. Her er det benyttet verdiene fra den dagen da kontrollprøvene for 600 ng/mL ble opparbeidet. Linearitetsrekken av rene standarder i Milli-Q vann, se avsnitt 3.9, ga tilnærmet samme areal når den ble analysert ved starten av analysen, som midt mellom prøvene opparbeidet over de to dagene. Dette viser at det ikke var noen nedgang i instrumentets sensitivitet gjennom analysen, og det var derfor tilstrekkelig å studere prøvene opparbeidet under én av dagene.

Linearitetsrekkene ble opparbeidet i spiket utløpsvann. For å få et areal tilsvarende spike-konsentrasjonen, måtte det sees bort i fra konsentrasjonen av legemidlene som allerede var tilstede i avløpsvannet. Arealet til gjennomsnittet av matriksblindprøvene over de to dagene ble derfor subtrahert fra de resterende prøvene. Dette medførte at et av punktene i linearitetsrekken ble ekskludert, og linearitetsrekken inkluderte dermed kun 6 punkter. Rådata der matriksblindverdien er trukket fra, samt beregnet gjennomsnitt SD og RSD for linearitetsrekken og kontrollprøvene, er for alle legemidlene gitt i Vedlegg A. Prøver som ga et areal lavere enn LOQ er ikke vist. I samme tabell er det gitt de relative retensjonstidene til alle legemidlene i forhold til deres valgte internstandard. I de tilfeller der arealet til analyttens er lavere enn LOQ, er den relative retensjonstiden ekskludert. Kravene satt i EU-direktiv 2002/657/EC (European Community 2002) sier at RSD til den relative retensjonstiden må være innenfor 2,5 %. Alle legemidlene viste resultater innenfor dette området.

LOD og LOQ er for alle legemidlene gitt i Tabell A 108, se Vedlegg A. Disse verdiene er beregnet ved hjelp av en noe modifisert versjon av likningen gitt av IUPAC (1997), se Figur 2-2 (Oehme 2007). 3 ble benyttet som k for LOD, og 10 ble benyttet som k for LOQ. Det ble benyttet standardavviket for de 4 matriksblindprøvene opparbeidet under metodevalideringen. Gjennomsnittet til matriksblindprøvene ble ikke tatt med i likningen, og ble derfor satt til 0. LOD og LOQ ble dermed beregnet etter likningene gitt i likning 13 og 14.

$$\text{LOD} = 3 * \text{standardavviket til matriksblind} \quad (13)$$

$$\text{LOQ} = 10 * \text{standardavviket til matriksblind} \quad (14)$$

Det ble ikke analysert noen prøver i avløpsvann spiket til en konsentrasjon lavere enn 25 ng/mL. I de tilfellene der beregnet LOD og LOQ er under denne konsentrasjonen, er beregningene utført ved ekstrapolering. Dette gir en usikkerhet i LOD og LOQ for de legemidlene dette gjelder, se Tabell A 108, Vedlegg A. For noen av ionene til legemidlene var estimert LOD og LOQ 0 ng/mL. Det er ikke reelt å forvente en LOD/LOQ på 0 ng/mL, og i disse tilfellene ble det derfor benyttet en av de andre LOD/LOQ-verdiene for legemiddelet. For å kunne vektlegge prøvene i nedre konsentrasjonsområde, ble det vurdert en vekting. Dette ga imidlertid ikke mer reelle resultater for disse legemidlene, og det er derfor videre operert med ikke-vektede resultater.

Ved hjelp av LINEST-funksjonen til Microsoft Excel ble lineariteten vurdert ved å studere avviket på måleområdet, 95 % konfidensintervallet til skjæringspunktet med Y-aksen, F-verdien og korrelasjonsfaktoren, R^2 -verdien. Data for alle legemidlene er gitt i Vedlegg A.

Videre ble det utført en responsfaktortest, der arealet til legemiddelet ble delt på legemiddelkonsentrasjonen i ng/mL. Da bruk av internstandard ble valgt bort under metodevalideringen, ble ikke analyttens respons delt på internstandardens respons, slik som beskrevet i avsnitt 2.1. Gjennomsnittet av verdiene er gitt i Tabell A 109. I følge H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010) bør responsfaktortesten gi en RSD på under 15 %. De tilfellene der dette kravet ikke ble overholdt, er diskutert under avsnittet for hvert enkelt legemiddel.

Som tidligere nevnt er det i EU-direktiv 2002/657/EC (European Community 2002) satt et krav til den relative ioneintensiteten. De spesifikke kravene er gitt i avsnitt 2.1. Tabell A 110, viser den relative ioneintensiteten og variasjonen for 8 av de 15 legemidlene, samt sulfadoxin. Kravene ble overholdt for de fleste av legemidlene. Imidlertid viste losartan, prednisolon og simvastatin en høyere RSD.

Det ble opparbeidet 6 kontrollprøver over 2 nivå i linearitetsrekken, her 600 ng/mL og 100 ng/mL. For å kunne anse presisjonen som tilfredsstillende eller god, var det ønskelig med en RSD på < 15 %. RSD høyere enn dette, tilsier at presisjonen er dårlig eller ikke tilfredsstillende. Som tidligere nevnt var verdiene for linearitetsrekken tilnærmet like, og det er derfor kun oppgitt verdier fra én av dagene. Her ble det benyttet verdiene fra den dagen da kontrollprøvene for 600 ng/mL ble opparbeidet. Verdiene for s-prøvene til de 6 prøvene

á 100 ng/mL, er for alle legemidlene gitt i Vedlegg A. Dessverre ga alle M-prøvene svært varierende resultat, for alle legemidlene, og dette var langt fra forventede verdier. Alle disse prøvene ble derfor valgt bort. Gjennomsnittlige verdier av arealet for både 600 ng/mL og 100 ng/mL for alle legemidler er gitt i Tabell A 111. For kontrollprøvene ved 600 ng/mL ga én av prøvene et areal tydelig forskjellig fra de andre kontrollprøvene. På grunn av den store differansen i respons for denne prøven, kan det konkluderes med at det trolig har skjedd en feil under opparbeidelse av prøven. Denne ble dermed valgt bort under videre arbeid. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL, ble lignende avvik observert for 2 av prøvene. Dette indikerer at det også her har forekommet feil under opparbeidelsen av prøvene. Disse ble derfor også valgt bort under videre arbeid. Arealet er for alle tilfellene tatt med i rådatatabellene, Vedlegg A.

For å se på nøyaktigheten, estimert ved å studere tilsynelatende gjenfinning over de 2 nivåene, ble det benyttet de lineære regresjonslinjene gitt ved hjelp av LINEST, se Vedlegg A. Den samme lineære regresjonslinjen er gitt i kalibreringskurven til hvert av legemidlene, se under avsnittet for hvert enkelt legemiddel. Konsentrasjonen i ng/mL ble estimert ved å sette gjennomsnittlig areal inn i de lineære regresjonslinjene. Videre kan konsentrasjonen bestemmes ut i fra responsfaktoren mellom analytten og internstandard, se avsnitt 2.1. På grunn av internstandardens svært varierende respons, og den usikkerheten dette ga, ble imidlertid denne metoden valgt bort. De estimerte konsentrasjonene er gitt i Tabell A 112. Metodens nøyaktighet ble vurdert ut i fra prosentvis avvik mellom reell og estimert konsentrasjon i kontrollprøvene. For 600 ng/mL prøvene var det ønskelig med et avvik på $\leq 10\%$, og for 100 ng/mL prøvene var det ønskelig med et avvik $\leq 20\%$.

Videre ble R^T , R^{MS} og R^{PO} beregnet etter likningene gitt i avsnitt 2.1 Rådata og beregning for hvert legemiddel er gitt i Vedlegg A, og gjennomsnittlige verdier er gitt i Tabell A 113. Matriksblind S-prøven spiket til 100 ng/mL ga et høyere areal enn matriksprøvene ved 600 ng/mL. Dette indikerer at det har skjedd en feil under spikingen. På grunn av dette er kun R^T , R^{MS} og R^{PO} beregnet ved hjelp av kontrollprøvene ved 600 ng/mL. Videre ble det utført en ionesuppresjonstest. Kromatogrammene fremkommer under avsnittet for hvert enkelt legemiddel.

Det var ønskelig å undersøke gjenfinning av tilsatt internstandard ved hjelp av gjenfinningsstandard. Det viste seg imidlertid at det ikke var mulig med kvantitativ analyse

av metoprolol og metoprolol-D₇, se eget avsnitt om metoprolol. Gjenfinningen av tilsatt internstandard kunne her derfor ikke vurderes.

Metodens sensitivitet for de ulike legemidlene ble også studert. Sensitiviteten ble vurdert på grunnlag av stigningstallet til den lineære regresjonslinjen til de ulike legemidlene. Ved bruk av kvantifiseringsionet til de ulike legemidlene, viser sulfadoxin, amlodipin, ketoprofen, trimetoprim og losartan en god sensitivitet. Dette fordi den lineære regresjonslinjen til de ulike legemidlene ga et tydelig høyt stigningstall mellom 183 - 521, de fleste liggende ved ca. 250. Både for losartan og trimetoprim ga S-prøvene høyere stigningstall enn M-prøvene.

Sulfametoksazol ga et stigningstall på ca. 126, noe som er lavere enn fordi de nevnte legemidlene. Metodens sensitivitet var likevel fortsatt å anse som høy for legemiddelet. Simvastatin og prednisolon viste tilnærmet like høy sensitivitet, med et stigningstall på ca. 90.

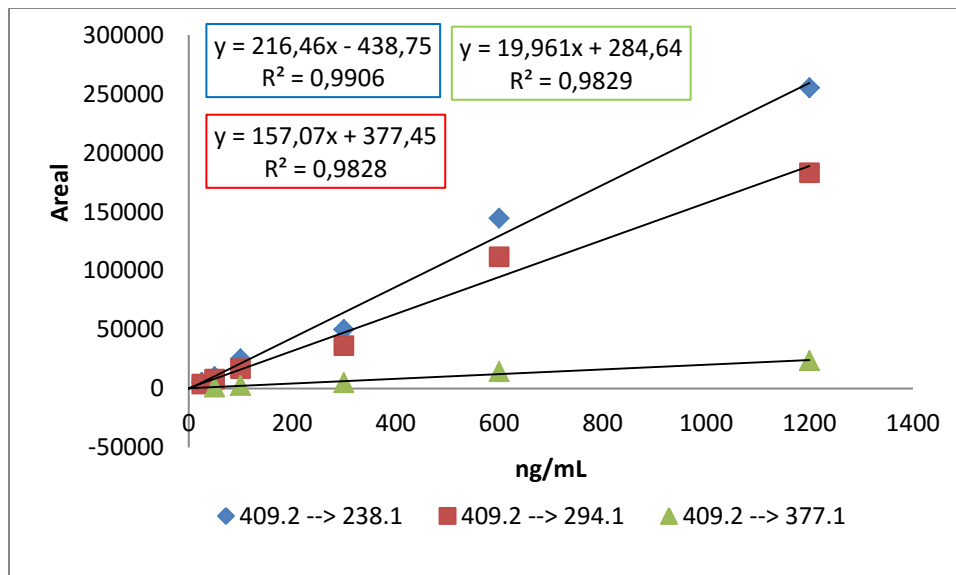
Benzylpenicillin og ibuprofen viste begge svært lav sensitivitet, med et stigningstall mellom 7 - 25. På grunn av den lave sensitiviteten, kunne ingen av konfirmeringsionene til legemidlene detekteres. Ciprofloksacin viste en svært lav sensitivitet for M-prøvene. For S-prøvene lå imidlertid stigningstallet på ca. 90, noe som plasserer legemiddelet i samme kategori som simvastatin og prednisolon.

En fullstendig SOP for de legemidlene der metoden var å anse som egnet, er gitt i Vedlegg A. Som en mal for utarbeidelse av denne, ble det benyttet «H-KL 35», en SOP av Kjemilaboratoriet NMBU (2014) for cereulide analyse i ris, pasta, melk og fløte.

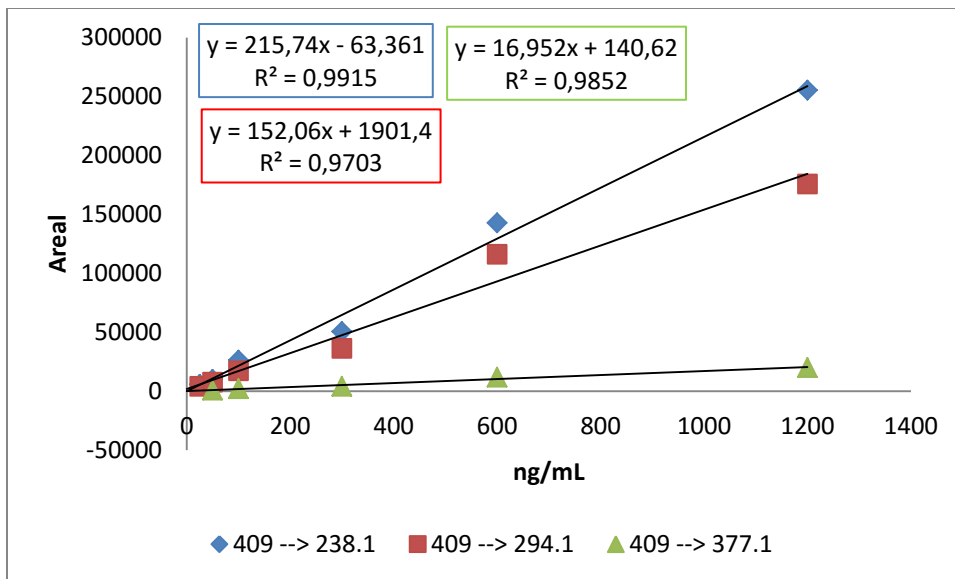
Amlodipin

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til amlodipin er gitt i Tabell A 33 og Tabell A 34, se Vedlegg A. Resultatene som ble oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 35.

Kvantifiseringsionet til amlodipin, overgangen 409.2 → 238.1, ga en R^2 -verdi på 0,991 ved analyse av S-prøvene og 0,992 ved analyse av M-prøvene. Konfirmeringsionene, med overgangene 409.2 → 294.1 og 409.2 → 377.1, ga R^2 -verdier på henholdsvis 0,983/0,970 og 0,983/0,985. Begge F-verdiene gitt i Tabell A 35 er betydelig høyere enn 10,13 og 7.71, som var F-kritisk verdi for 4 og 3 frihetsgrader, se Tabell 2-1. Det kan derfor med 95 % sikkerhet sies at dataene følger en lineær trend. Kalibreringskurvene er gitt i Figur 4-4-og Figur 4-5.



Figur 4-4 Kalibreringskurve for S-prøvene til amlodipin sine utvalgte ioner i avløpsvann.



Figur 4-5 Kalibreringskurve for M-prøvene til amlodipin sine utvalgte ioner i avløpsvann.

I H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010) er det satt krav til at 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet med Y-aksen, skal inkludere verdien 0. Tabell A 35 viser at dette stemmer for alle ionene til amlodipin, dette både i S-prøvene og i M-prøvene. Tabell A 35 viser også at kvantifiseringsionet til amlodipin har et avvik på måleområdet på < 5 %, noe som er innenfor grensene gitt i H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010). Begge konfirmeringsionene viser imidlertid større avvik.

Tabell A 111 viser at RSD for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, lå mellom 4,7 - 7,5 % i S-prøvene for kvantifiseringsionet og konfirmeringsionet 294.1. Dette indikerer en god presisjon. For alle M-prøvene, og for S-prøven til konfirmeringsionet 377.1, viser imidlertid kontrollprøvene en RSD mellom 30,2 - 44,6 %. Dette lot seg reflektere i responsfaktortesten, der nevnte ion viste en RSD mellom 25 - 33 %. Usikkerheten i legemiddelets respons i M-prøvene, og for konfirmeringsionet 377.1, var å anse som stor.

RSD for kontrollprøvene ved 100 ng/mL lå mellom 15,5 - 32,8 %, der konfirmeringsionet 377.1 ga et betydelig høyere avvik enn de to andre ionene. Kravet til RSD var 15 %. Det ble derfor konkludert med at metoden ikke viste tilfredsstillende presisjon for amlodipin i prøver med så lav konsentrasjon.

Tabell A 112 viser at estimert konsentrasjon beregnet på grunnlag av gjennomsnittet til kontrollprøvene ved 600 ng/mL hadde et avvik på > 10 % for kvantifiseringsionet og

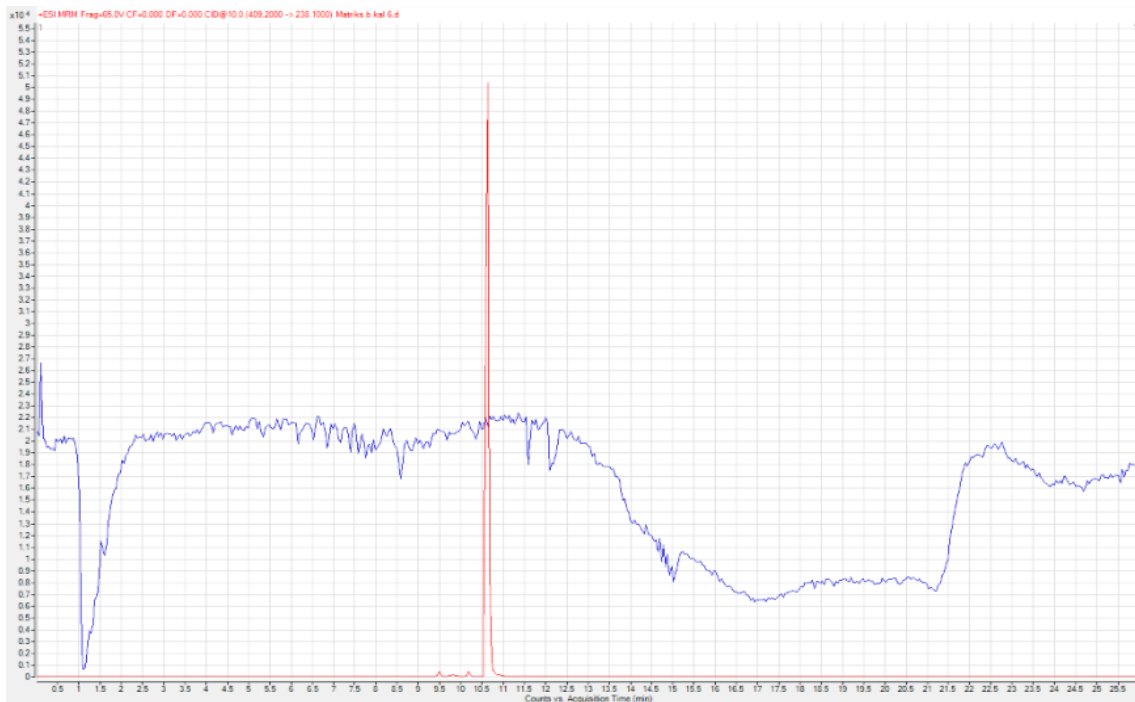
konfirmeringsionet 294.1 i S-prøvene. Konfirmeringsionet 377.1 viste et avvik på kun 4,65 %. M-prøvene viste imidlertid ikke samme trend. Her viste kvantifiseringsionet og konfirmeringsionet 377.1 et avvik på >10 %, mens konfirmeringsionet 294.1 ga et avvik på 5,33 %. Dette indikerer dårlig nøyaktighet i metoden. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL ga alle tre ionene en tilfredsstillende nøyaktighet med et prosentvis avvik på 1,75 - 9,67 %.

Som tidligere nevnt, ble det utført en ionesuppresjonstest ved hjelp av matriksblind M-prøve. Kromatogrammet som ble opparbeidet for kvantifiseringsionet til amlodipin, 238.1, er illustrert i Figur 4-6. De to konfirmeringsionene viser samme kromatogram som kvantifiseringsionet, og er derfor ikke illustrert.

Tabell A 37 og Tabell A 38 viser tilnærmet likt areal for amlodipin i de fleste S- og M-prøvene ved 600 ng/mL. Imidlertid viser M-prøvene mer variasjon, og 2 av 5 prøver ga ca. halvparten så stort areal sammenlignet med de resterende prøvene. Årsaken til dette er ukjent. Samme løsning ble benyttet til spikingen i alle parallellene, og lignende trend ble ikke observert for de resterende legemidlene i spike-løsningen. Da ikke alle M-prøvene ga et lavere areal, kan det ikke konkluderes med noen interaksjon mellom amlodipin og PSA. Det indikerer likevel en større usikkerhet i resultatene ved M-prøvene enn ved S-prøvene.

Videre lå R^{MS} på ca. 60 % for S-prøvene og ca. 25 % for M-prøvene, noe som indikerer at avløpsvannmatriksen førte til en ionesuppresjon. Ut i fra R^{MS} var suppresjonen større i M-prøvene enn i S-prøvene. Tabell A 113 viser at R^{PO} var på ca. 60 % i S-prøvene, og på ca. 110 % i M-prøvene. Det er ikke mulig med en høyere gjenfinning lengre ut i prøveoppbeholdelsen, og det er heller ikke å forvente en større matrikseffekt etter dSPE-steget. Arealet i spiket matriksblind var langt lavere etter at M-prøven ble spiket enn når S-prøven ble spiket, og som tidligere nevnt er arealet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL tilnærmet like stort i S- og i M-prøvene. Dette indikerer en feil ved analyse av spiket matriksblind. Det kan derfor ikke konkluderes noe om avløpsvannets matrikseffekt på amlodipin eller gjenfinning i prøveoppbeholdelsen.

De resultatene som indikerer en ionesuppresjon, stemmer ikke overens med resultatene i ionesuppresjonstesten for amlodipin sitt kvantifiseringsion, se Figur 4-6. Kromatogrammet viser ingen endring i respons for amlodipin-toppen, noe som indikerer at det ikke har forekommet noen matrikseffekt.



Figur 4-6 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten for amlodipin sitt kvantifiseringsion, 238.1, med en M-prøve matrisblind.

Resultatene bekrefter valg av kvantifiseringsion, da amlodipin sitt ion 238.1 viste en høyere R^2 -verdi og en høyere sensitivitet sammenlignet med de to andre ionene. På grunn av konfirmeringsionet 377.1 sin svært lave sensitivitet, samt den store usikkerheten i forbindelse med målt areal, velges dette ionet bort under videre arbeid.

Presisjonen for S-prøvene ved 600 ng/mL er å anse som tilfredsstillende. Dette er imidlertid ikke tilfelle for kontrollprøvene ved 100 ng/mL. Til tross for en tilsynelatende tilfredsstillende gjenfinning for nevnte prøver, medfører den dårlige presisjonen at metoden ikke er å anse som egnet for analyse av prøver med så lav konsentrasjon. Kontrollprøvene ved 600 ng/mL viser generelt sett dårlig nøyaktighet. Dette, sammen med den dårlige presisjonen for M-prøvene, viser at metoden har flere svakheter ved analyse av amlodipin. Det må derfor arbeides videre med å optimalisere metodeparameterne, før metoden kan anses som egnet for kvantitativ analyse av dette legemiddelet.

Benzylpenicillin

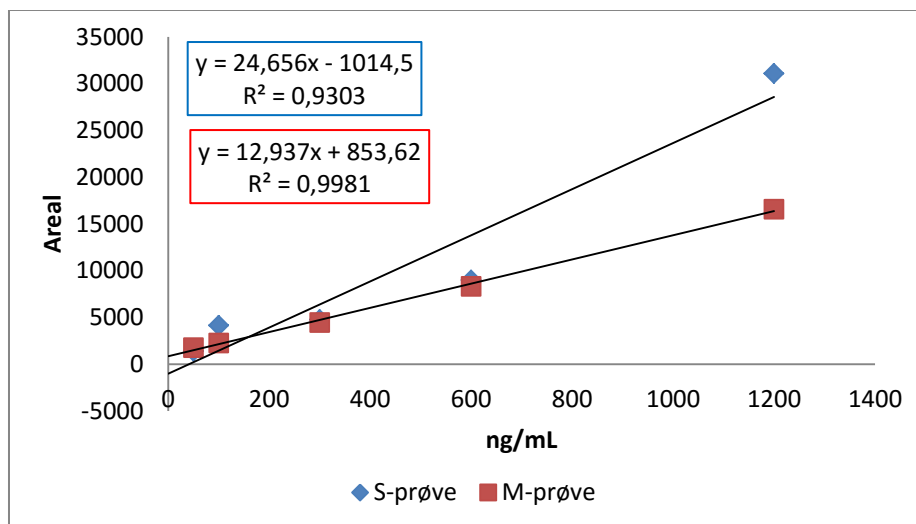
Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til benzylpenicillin er gitt i Tabell A 39 og Tabell A 40, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 41.

Det ble analysert for 3 ulike overganger for benzylpenicillin, $335 \rightarrow 217$, $335 \rightarrow 176$ og $335 \rightarrow 160$. Kun overgangen $335 \rightarrow 217$ ga et areal tydelig forskjellig fra 0, og benzylpenicillin analyseres derfor uten konfirmeringsion.

Benzylpenicillin viste generelt sett bedre lineær oppførsel i M-prøvene enn i S-prøvene, der S-prøvene ga en R^2 -verdi på 0,930, og M-prøvene ga en R^2 -verdi på 0,998. Videre lot dette seg gjenspeile i de to F-verdiene, der S-prøvene hadde en F-verdi på 40 og M-prøvene hadde en F-verdi på 1 596. Avviket på måleområdet lå på <5 % for M-prøvene, mens det for S-prøvene lå på 15,8 %. Kun S-prøvene ga et 95 % konfidensintervall for skjæringspunktet med Y-aksen inneholdende 0. Konfidensintervallet for M-prøvene inneholdt kun positive verdier.

Kalibreringskurven for kvantifiseringsionet i matriks er gitt i Figur 4-7. For S-prøvene avviker prøven ved 600 ng/mL tydelig fra trendlinjen, og arealet var langt lavere enn forventet. For M-prøvene stemte verdiene godt med hva som var forventet ut i fra linjen. Det er ikke analysert prøver med konsentrasjon mellom 600 ng/mL og 1200 ng/mL. Uten flere punkter i dette konsentrasjonsområdet, kan det ikke konkluderes med hvilken prøve som avviker. For å kunne si noe mer om lineariteten i dette området må det studeres flere prøver med konsentrasjon mellom 600 ng/mL og 1200 ng/mL.

Responsfaktortesten for S-prøvene ga en RSD på 32 %, og for M-prøvene en RSD på 41 %. Det store avviket indikerer en dårlig korrelasjon mellom areal og konsentrasjon. Legemiddelet viste i kalibreringskurven en tilsynelatende lineær respons for M-prøvene. Imidlertid hadde kontrollprøvene ved 600 ng/mL et langt høyere areal sammenlignet med prøven ved samme konsentrasjon i linearitetsrekken. Kalibreringskurven viste dermed et urealistisk bilde av det lineære forholdet mellom konsentrasjon og respons for benzylpenicillin.



Figur 4-7 Kalibreringskurve for benzylpenicillin i avløpsvann

Det relative standardavviket var generelt sett svært høyt, og varierte mellom 30,1– 35,6 % for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. Dette indikerer en dårlig presisjon i metoden. Avviket for kontrollprøvene ved 100 ng/mL lå i samme størrelsesområde på 33,6 %, og presisjonen var også her å anse som dårlig. Videre lå estimerte konsentrasjoner langt fra reell konsentrasjon, der kontrollprøvene ved 600 ng/mL viste et avvik på 129 % for M-prøvene. For S-prøvene var avviket imidlertid kun 8,39 %. Kontrollprøven ved 100 ng/mL viste et avvik på 99,0 %. Dette viser en svært dårlig nøyaktighet i metoden.

Rådata og beregning av R^T , R^{PO} og R^{MS} er gitt i Tabell A 43 og Tabell A 44 i Vedlegg A. Gjennomsnittlige verdier er gitt i Tabell A 113. Det ble også utført en ionesuppresjonstest. Benzylpenicillin viste imidlertid en svært lav respons ved denne testen, og det opparbeidede kromatogrammet kan derfor ikke benyttes.

Tabell A 113 viser at R^T og R^{PO} var henholdsvis 42,6 % og 32,5 % i S-prøvene, og 52,9 % og 43,4 % i M-prøvene. Videre var R^{MS} på 131,4 % i S-prøvene og 121,9 % i M-prøvene. Usikkerheten i metoden er imidlertid stor og differansen i gjenfinning er liten. Det kan derfor ikke konkluderes med at forskjellen er signifikant. Under arbeid med ren standard indikerte resultatene at benzylpenicillin kunne interagere med PSA. Dette skyldes legemiddelets karboksylsyregruppe. Resultatene, der R^{PO} var i samme størrelsesområde for S- og M-prøvene, indikerer imidlertid at det ikke forekom interaksjon ved bruk av denne konsentrasjonen PSA.

R^{MS} lå mellom ca. 122 - 131 %, noe som forteller at matriksen ga en økning i respons for benzylpenicillin. R^{PO} lå kun mellom 33 - 43 %, og gjenfinningen i prøveopparbeidelsen var å anse som lav. Dette, i tillegg til metodens dårlige presisjon og nøyaktighet, gjør at metoden ikke er å anse som egnet for kvantitativ analyse av benzylpenicillin. Arealet til kvantifiseringsionet 335 \rightarrow 217 er imidlertid signifikant større enn 0, og metoden er derfor egnet for kvalitativ analyse av legemiddelet.

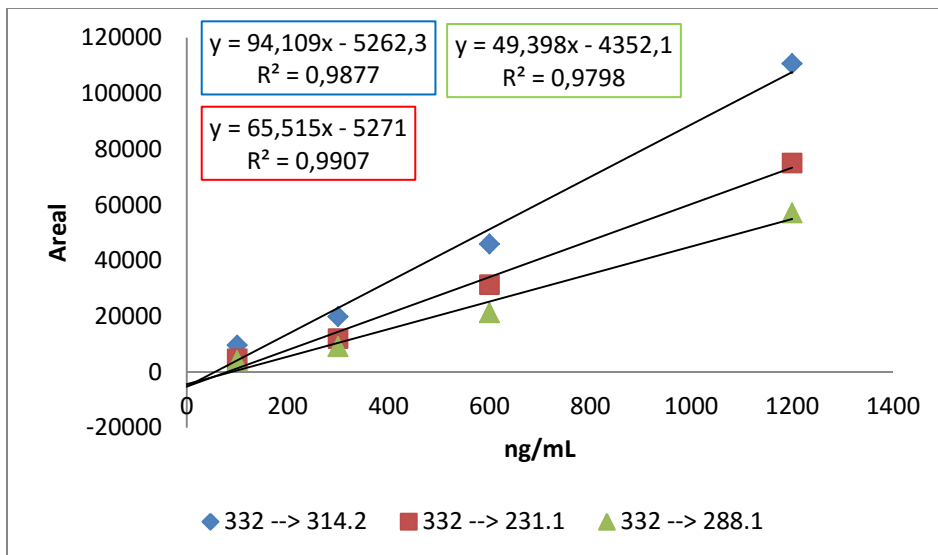
Ciprofloksacin

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til ciprofloksacin er gitt i Tabell A 45 og Tabell A 46, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 47.

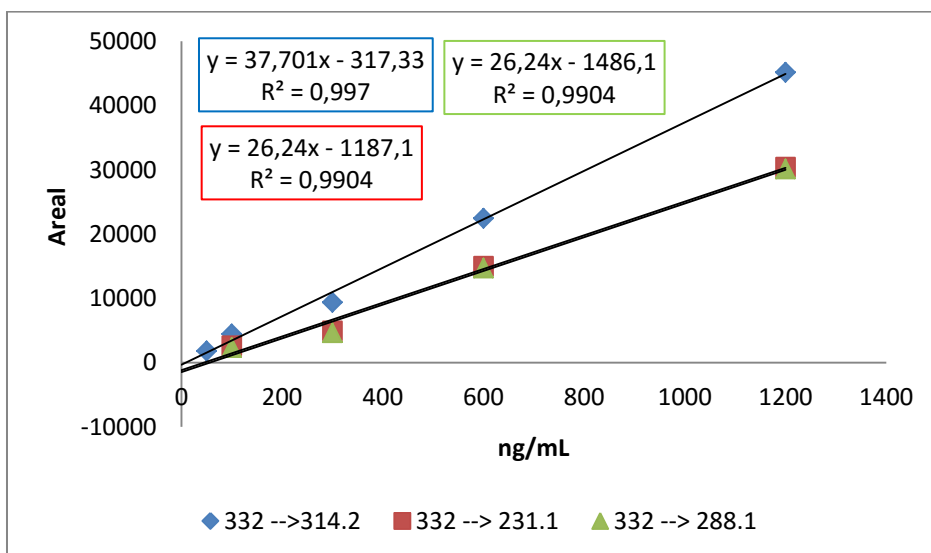
Ciprofloksacin viser en relativt høy LOQ, se Tabell A 108, Vedlegg A. På grunn av dette, var det kun prøver med konsentrasjon ≥ 100 ng/mL som ga kvantifiserbare resultater. Linearitetsrekken inneholdt dermed kun 4 punkter istedenfor 7, som var det antall prøver som var opparbeidet for å lage rekken. Til tross for at det i utgangspunktet var stilt krav til minimum 5 punkter, ble det valgt å gå videre med linearitetsrekken til ciprofloksacin.

Ciprofloksacin eluerer ut etter ca. 7,31 minutter. Etter ca. 1,5 minutter, som er den tiden det tar for mobilfasen å bevege seg gjennom kolonnen, ble det i kromatogrammet observert en topp med MRM-overgangene til ciprofloksacin, se Figur A 2, Vedlegg A. Arealet til denne toppen varierte imidlertid mye, og arealet korrelerte ikke nødvendigvis med ciprofloksacin-konsentrasjonen i prøven. Arealet for toppen etter 7,31 minutter korrelerte imidlertid med tilsatt konsentrasjon av ciprofloksacin. Til tross for toppen etter 1,5 minutter, og eventuelle usikkerheter denne medfører, ble det valgt å gå videre med ciprofloksacin sine resultater. Dette uten noen form for korreksjon av arealet. Årsaken til den ekstra toppen ble ikke identifisert.

Kalibreringskurvene for ciprofloksacin viste både for S- og M-prøvene en R^2 -verdi lik eller over det satte kravet på $\geq 0,980$. R^2 -verdiene var henholdsvis 0,988/0,997 for kvantifiseringsionet $332 \rightarrow 314.2$ sine S- og M-prøver, 0,991/0,990 for $332 \rightarrow 231.1$ og 0,980/0,990 for $332 \rightarrow 288.2$. M-prøvene viste et bedre lineært forhold sammenlignet med S-prøvene. F-verdiene ga samme indikasjon. Alle F-verdiene lå over F-kritisk verdi på 10,13 ved 3 frihetsgrader, se Tabell 2-1. Videre viste M-prøvene generelt sett høyere F-verdi enn S-prøvene. Kalibreringskurvene for ciprofloksacin sin linearitetsrekke i matriks er gitt i Figur 4-8 og Figur 4-9.



Figur 4-8 Kalibreringskurve for S-prøvene til ciprofloksacin sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-9 Kalibreringskurve for M-prøvene til ciprofloksacin sine utvalgte ioner i avløpsvann

Tabell A 47 viser at alle ionene hadde et 95 % konfidensintervall for skjæringspunktet med Y-aksen som inkluderte verdien 0. I nesten alle tilfellene var avviket på måleområdet større enn det satte kravet. Unntaket var for M-prøven til kvantifiseringsionet, der avviket lå mellom 6,8 - 10,2 %.

Tabell A 111 viser at RSD til kontrollprøvene ved 600 ng/mL varierte mellom 12,3 - 21,1 %. Som oftest var RSD noe høyere for S-prøvene enn for M-prøvene. Dette henger sammen med en høyere RSD for responsfaktortesten til S-prøvene. Presisjonen var ikke å anse som tilfredsstillende i noen av tilfellene. RSD var lavere for 100 ng/mL prøvene, der RSD varierte

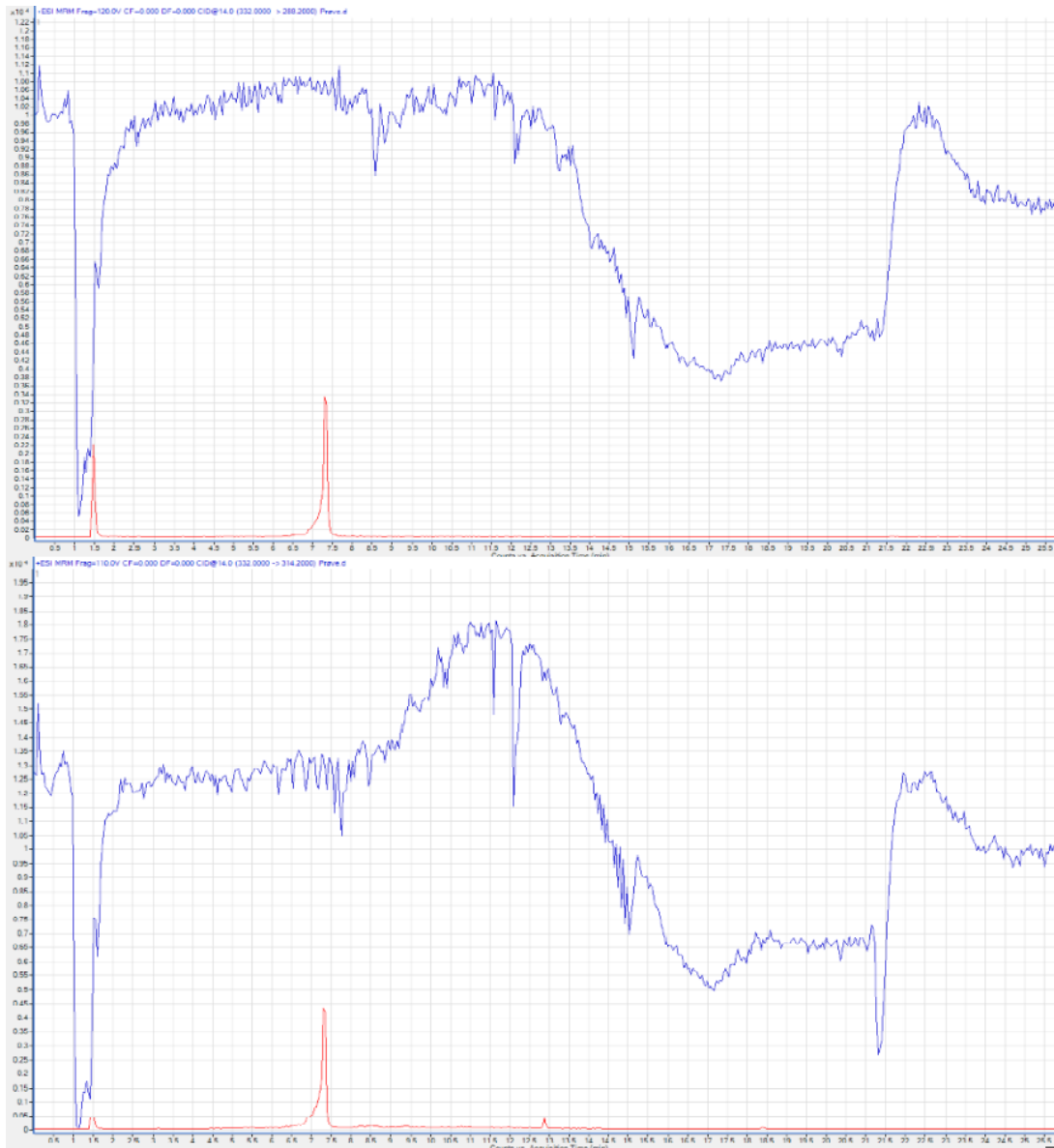
mellom 10,5 - 12,7 %. Presisjonen var å anse som tilstrekkelig for kontrollprøvene ved 100 ng/mL.

For S-prøvene lå estimert konsentrasjon i kontrollprøvene over 2 konsentrasjoner langt fra den reelle konsentrasjonen, se Tabell A 112. S-prøvene ved 600 ng/mL viste avvik mellom 24,4 - 31,0 %, og kontrollprøvene ved 100 ng/mL viste avvik mellom 52,8 - 79,6 %. Nøyaktigheten var derfor å anse som dårlig. Gjennomsnittet til kontrollprøvene ved 600 ng/mL viste et generelt lavere areal. Dette sammenlignet med prøven med samme konsentrasjon som ble benyttet under linearitetsrekka. Dette er årsaken til den tilsynelatende tilfredsstillende lineariteten mens nøyaktigheten likevel er dårlig. Dette ble bekreftet i responsfaktortesten, der denne i alle tilfellene viste en RSD over kravet på 15 %. Dette indikerer en dårlig korrelasjon mellom respons og konsentrasjon. RSD lå på henholdsvis 29 % for S-prøvene og 18 % for M-prøvene til kvantifiseringsionet, 22/18 % for konfirmeringsionet 231.1, og 22/18 % for 288.2. Responsfaktoren var generelt sett noe lavere for kontrollprøvene ved 600 ng/mL sammenlignet med de resterende prøvene i linearitetsrekka.

For M-prøvene lå estimert konsentrasjon i kontrollprøvene nærmere reell konsentrasjon, og avviket varierte mellom 8,74 - 16,9 %. Kvantifiseringsionet hadde imidlertid et høyere avvik enn kravet på 10 %, og nøyaktigheten var derfor å anse som dårlig. Nøyaktigheten, estimert ut i fra tilsynelatende gjenfinning, var imidlertid å anse som tilstrekkelig ved M-prøvene til begge konfirmeringsionene. Til tross for indikasjonen om en bedre nøyaktighet for konfirmeringsionene, ble det valgt å gå videre med kvantifiseringsion 314.2. Dette da nevnte ion viste en høyere sensitivitet enn begge konfirmeringsionene.

Tabell A 113 viser at R^{MS} ligger mellom 118 - 188 % for ciprofloksacin, og prosentvis gjenfinning var generelt sett høyest for S-prøvene. Dette indikerer at opprensningen med PSA har fjernet noen av de matrikskomponentene som påvirker legemiddelet, og gjenfinningen i M-prøvene lå nærmere 100 %. Kvantifiseringsionet og det ene konfirmeringsionet, 231.1, viste en tilnærmet lik R^{MS} . Det siste konfirmeringsionet, 288.2, viste en lavere prosentvis gjenfinning enn de to andre ionene. Årsaken til dette er ukjent, men en interferens av ionet i matriks er den mest trolige årsaken. På grunn av denne effekten ble nevnte ion valgt vekk under videre arbeid i matriks. Resultatene viser at matriksen gir en betydelig økning i respons, dette også for M-prøvene. Kromatogrammet fra ionesuppresjonstesten, se Figur 4-10, viser imidlertid ikke samme trend, der ingen økning i respons kan sees ved ciprofloksacin sin

retensjonstid. Ionesuppresjonstesten bekrefter imidlertid at konfirmeringsionet 288.2 påvirkes annerledes av matriksen enn de to andre ionene.



Figur 4-10 Kromatogrammet fra ionesuppresjonstesten av ciprofloksacin med matriksblind M-prøve. Konfirmeringsionet 288.2 vises øverst, og kvantifiseringsion 314.2 nederst.

R^{PO} for ciprofloksacin ligger mellom 12,5 - 19,0 %. Prosentvis gjenfinning var generelt sett noe høyere for S-prøvene enn for M-prøvene. Dette indikerer at noe av legemiddelet gikk tapt under dSPE-opprensningen. Dette stemmer overens med resultatene fra dSPE-optimaliseringen i rene standardløsninger, der det ble funnet en korrelasjon mellom arealet til ciprofloksacin og PSA-mengden. Differansen er imidlertid ikke spesielt stor.

Resultatene viser at metoden ikke er egnet for kvantitativ analyse av ciprofloksacin, da metoden viste både dårlig presisjon og dårlig nøyaktighet. Legemiddelets areal var imidlertid

tydelig forskjellig fra 0, og metoden er derfor å anse som egnet for kvalitativ analyse av legemiddelet.

Som nevnt i avsnitt 4.1.4 har fluorokinoloner og tetrasykliner en evne til å chelatere med di- og trivalente metallioner (Attwood & Florence 2012; Bourdat-Deschamps *et al.* 2014; Uivarosi 2013; Washington 1991). På grunn av dette ble det testet med tilsetning av Na₂EDTA. Denne har en høyere affinitet for metallionene, og vil dermed kunne frigjøre legemidlene fra kompleksene dannet (Anderson *et al.* 2005; Lopes *et al.* 2012; Peysson & Vulliet 2013; Uslu *et al.* 2008). Metodetesten, se avsnitt 4.1.6, viste ingen fordel ved å tilsette Na₂EDTA sammen med ekstraksjonssaltene under QuEChERS ekstraksjonen. Den svært lave gjenfinningen i metoden for ciprofloksacin, indikerer likevel at ciprofloksacin chelatert med di- og trivalente metallioner. Den lave gjenfinningen indikerer at ciprofloksacin i kompleks med metallionene ble holdt igjen på HLB-kolonnen, og at det chelaterte legemiddelet derfor ikke eluerte ut sammen med de andre legemidlene. Under videre arbeid bør det testet med å tilsette Na₂EDTA før SPE-ekstraksjonen med HLB-kolonnene. Dette for å frigjøre ciprofloksacin og tetrasyklin fra kompleksene, og få dem over i vandig fase. Dette vil kunne ha en heldig effekt, både med tanke på gjenfinning, linearitet, nøyaktighet og presisjon for legemidlene.

Under metodevalideringen kunne ikke tetrasyklin detekteres. På grunn av tetrasyklin sin evne til å chelatere med metallioner, i tillegg til at det heller ikke ble observert noen positiv effekt med tilsetning av Na₂EDTA under metodetesten, se avsnitt 4.1.6, ble det antatt at tetrasyklin oppførte seg på samme måte som ciprofloksacin. Det er derfor antatt at det også i dette tilfellet ville ha en positiv effekt å tilsette Na₂EDTA før SPE på HLB-kolonnene.

Ibuprofen

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til ibuprofen er gitt i Tabell A 51 og Tabell A 52, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 53.

Som nevnt, og illustrert i Tabell A 51 og Tabell A 52, ga ikke ibuprofen-D₃ samme store variasjon i areal i kontrollprøvene som for sulfadoxin-D₃. Likevel varierte arealet mellom 3 945 - 8 333 for de andre prøvene i linearitetsrekken. For å sjekke årsaken til denne variasjonen, ble det studert ibuprofen sin linearitet med og uten internstandard.

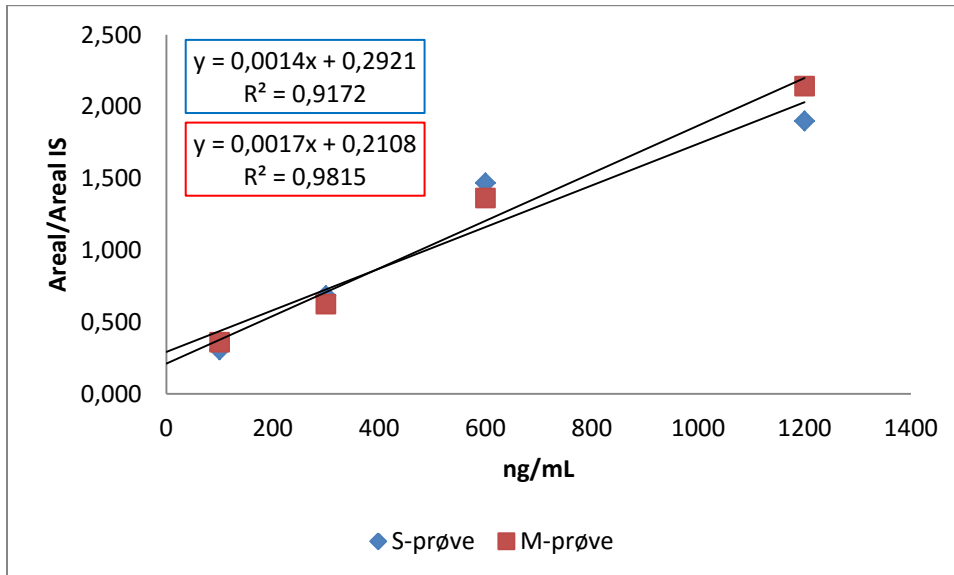
Det ble analysert for 3 ulike overganger for ibuprofen, 207 → 161, 207 → 119 og 207 → 105.1. Det var imidlertid kun overgangen 207 → 161 som ga tydelig areal forskjellig fra 0, og analysen av ibuprofen inneholdt derfor ingen konfirmeringsion.

Som tidligere nevnt ble arealet til matriksblindprøven subtrahert fra de resterende prøvene i linearitetsrekken. Dette medførte at linearitetsrekken inneholdt et punkt mindre. Videre var ibuprofen sin LOQ relativt høy, 70 ng/mL, noe som medførte at det kun kunne benyttes prøver med en konsentrasjon ≥ 100 ng/mL. Denne linearitetsrekken inneholdt derfor bare 4 punkter. For M-prøven hvor arealet ble studert alene, og S-prøven hvor legemiddelets areal ble delt på internstandardens, hadde prøven ved 1200 ng/mL et langt lavere areal enn forventet ut i fra trendlinjen. Dette indikerer at prøven ved 1200 ng/mL var utenfor det lineære området. Dette var også synlig i responsfaktortesten, der M-prøven ved 1200 ng/mL viste en responsfaktor med en verdi som var $\frac{1}{3}$ lavere enn gjennomsnittet. Under arbeidet med rene standarder lå 1200 ng/mL ibuprofen innenfor det lineære området, se Figur A 3, og den observerte effekten skyldes utløpsvannmatriksen.

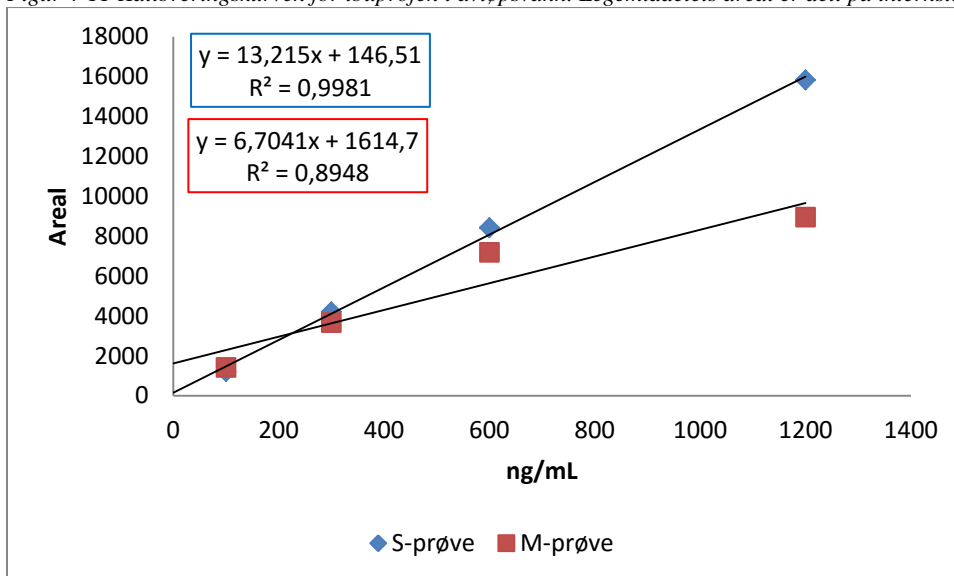
Ekskluderingen av 1200 ng/mL-prøven medførte at linearitetsrekken for M-prøven kun hadde 3 punkter. Dette er for lite til at linearitetsrekken kan benyttes til å estimere konsentrasjonen i ukjent prøve, og det kan derfor ikke sies noe eksakt om ibuprofen sin oppførsel i måleområdet. Under videre arbeid må en linearitetsrekke inneholde flere punkter mellom 100 - 1200 ng/mL. Beregningene utført via LINEST er for ibuprofen sin linearitetsrekke inkludert prøven ved 1200 ng/mL. LOD og LOQ er beregnet ut i fra denne regresjonslinjen.

Ibuprofen sine kalibreringskurver, se Figur 4-11 og Figur 4-12, indikerer en bedre linearitet for ibuprofen når legemiddelets areal ble benyttet alene, fremfor å deles på internstandardens

areal. Differansen var imidlertid ikke spesielt fremtredende. Dette indikerer at heller ikke internstandarden ibuprofen-D₃ var tilsatt med god nok nøyaktighet og presisjon til å være egnet. Denne internstandarden ekskluderes dermed i det videre arbeidet under metodevalideringen.



Figur 4-11 Kalibreringskurven for ibuprofen i avløpsvann. Legemiddelets areal er delt på internstandardens areal.



Figur 4-12 Kalibreringskurven for ibuprofen i avløpsvann.

Tabell A 111 viser at RSD for kontrollprøvene ved 600 ng/mL varierte mellom 8,4 % for S-prøvene, og 27,7 % for M-prøvene. Dette indikerer at presisjonen ikke var tilstrekkelig for M-prøvene. Det store avviket kommer av den siste kontrollprøven ved 600 ng/mL, der arealet var omtrent halvparten så stort som for de andre kontrollprøvene. Da dette ikke var tilfellet for

alle de andre legemidlene når legemidlene var spiket fra en felles spikeløsning, ga det ikke grunnlag for å ekskludere prøven.

RSD for kontrollprøvene var, i begge tilfellene, større når legemiddelets areal ble delt på internstandardens areal. Dette bekrefter at internstandarden bør ekskluderes under videre arbeid med metodevalideringen. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL lå avviket på 28,5 %, og presisjonen var å anse som dårlig.

Tabell A 113 viser at R^{MS} lå mellom ca. 70 - 80 % for ibuprofen. Dette indikerer at matriksen i en viss grad førte til ionsuppresjon. Kromatogrammet fra ionsuppresjonstesten viser for lav respons for ibuprofen, og kan derfor ikke benyttes.

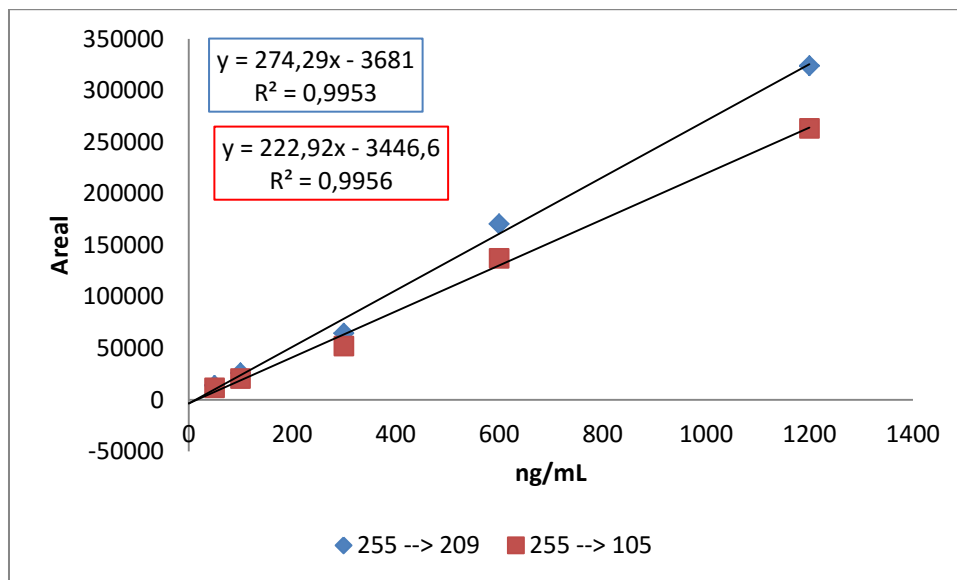
For ibuprofen ligger R^{PO} på ca. 75 - 85 %, noe som indikerer at små mengder av legemiddelet går tapt under analysen. Videre er R^{PO} relativt lik for S- og M-prøvene. Dette forteller at legemiddelet ikke tapes under dSPE-steget. Under arbeidet med ren standard indikerte resultatene at ibuprofen kunne interagere med PSA. Resultatene viste imidlertid at dette ikke forekom ved denne konsentrasjonen av PSA.

Da noen få av prøvene ga en respons innenfor linearitetsområdet til ibuprofen, kan ikke metoden benyttes for kvantitativ analyse av legemiddelet. Metoden er likevel egnet for kvalitativ analyse, da arealet er signifikant forskjellig fra 0. Videre arbeid bør inkludere en linearitetsrekke med flere punkter mellom 100 ng/mL og 1200 ng/mL. Dette for bedre å kartlegge ibuprofen sin oppførsel i avløpsvann. Videre bør det studeres flere produksjoner for ibuprofen, slik at legemiddelet kan kvantifiseres og konfirmeres med to separate ioner. Dette vil gi en større sikkerhet i kvantifiseringen.

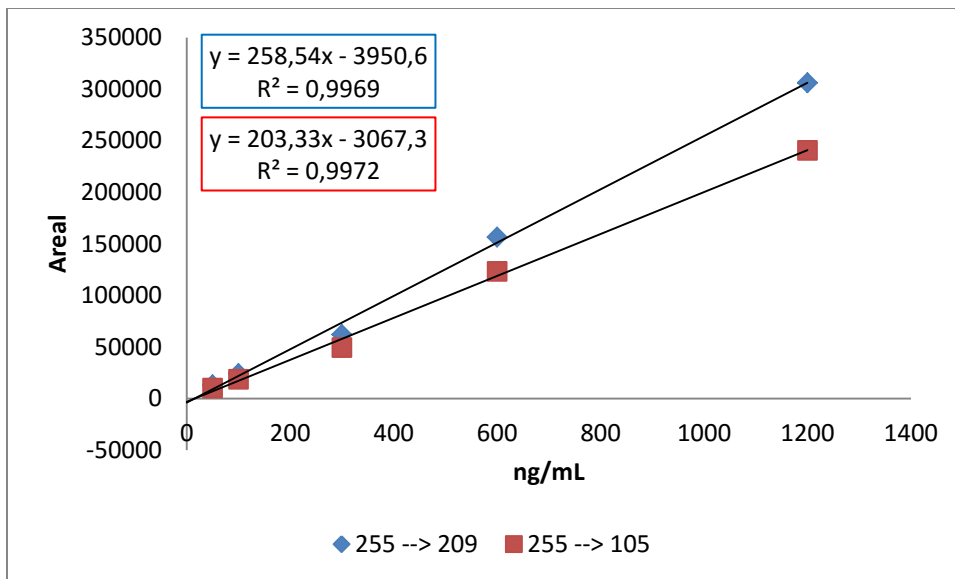
Ketoprofen

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til ketoprofen er gitt i Tabell A 57 og Tabell A 58, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 59.

Begge ketoprofen sine ioner viser R^2 -verdier som ligger over det kravet som er satt i H-KL 22 på 0,990 (Kjemilaboratoriet NVH 2010). R^2 -verdiene er henholdsvis 0,995/0,997 for kvantifiseringsionets 255 → 209 sine S- og M-prøver, og 0,996/0,997 for konfirmeringsionet, 255 → 105. I tillegg er F-verdiene mellom 636 - 1 076, noe som er langt over F-kritisk verdi på 7,71 ved 4 frihetsgrader, se Tabell 2-1. Dette bekrefter et lineært forhold mellom konsentrasjon og respons for ketoprofen. Kalibreringskurvene til ketoprofen er gitt i Figur 4-13 og Figur 4-14.



Figur 4-13 Kalibreringskurve for S-prøvene til ketoprofen sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-14 Kalibreringskurve for M-prøvene til ketoprofen sine utvalgte ioner i avløpsvann

Videre viste Tabell A 59 at alle ketoprofen sine ioner viste et avvik på måleområdet på < 5 %. 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet med Y-aksen inneholdt også verdien 0 i alle tilfellene.

Tabell A 111 viser en RSD mellom 2,8 - 3,5 % for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, noe som indikerer at presisjonen er tilfredsstillende ved høye konsentrasjoner. Kontrollprøvene ved 100 ng/mL viste et avvik mellom 11,5 - 12,8 %, noe som i tillegg indikerer en tilfredsstillende presisjon ved lave konsentrasjoner.

Tabell A 112 viser en estimert konsentrasjon nær reell konsentrasjon, dette både for prøvene ved 600 ng/mL og 100 ng/mL. Avviket lå mellom 0,03 - 2,87 % for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, og mellom 5,88 - 6,59 % ved 100 ng/mL. Det ble derfor konkludert med at nøyaktigheten i metoden var god for ketoprofen. Dette både ved lave og høye konsentrasjoner.

R^{PO} ligger på ca. 100 % for ketoprofen, og legemiddelet tapes ikke under noen av stegene under analysen, se Tabell A 113. Under arbeidet med rene standarder indikerte resultatene at ketoprofen kunne interagere med PSA. Dette på grunn av legemiddelets karboksylsyrergruppe. Resultatene indikerer imidlertid at dette ikke var tilfellet ved denne konsentrasjonen PSA.

R^{MS} lå på ca. 45 %. Dette tyder på at matriksen førte til en ionesuppresjon. Denne suppresjonen vises også i kromatogrammet for kvantifiseringsionet under

ionesuppresjonstesten, se Figur 4-15. Ved ketoprofen-toppen kan det observeres en omtrentlig halvering i ketoprofen sin respons. Konfirmeringsionet ga et kromatogram med samme trend.



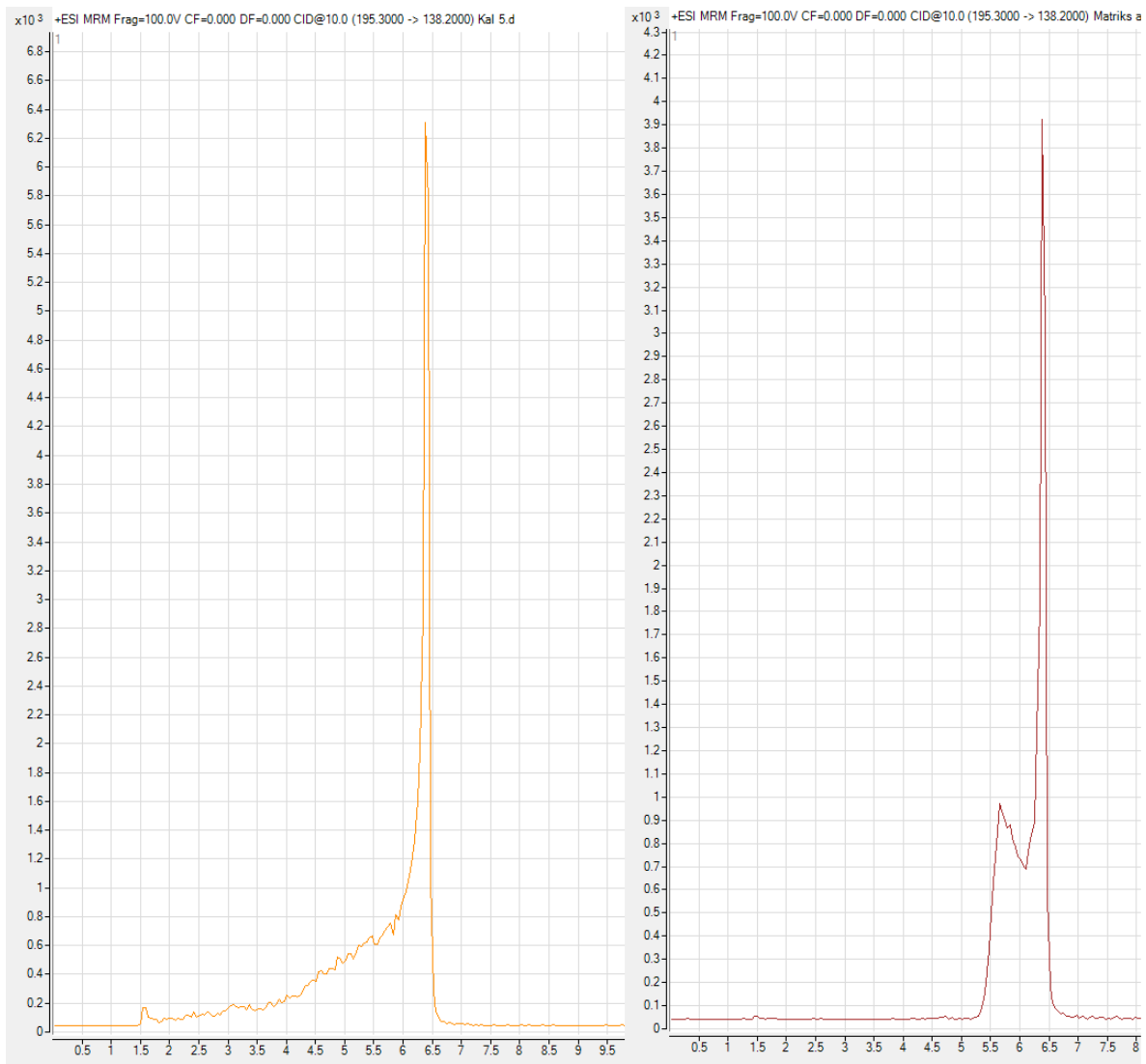
Figur 4-15 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av ketoprofen sitt kvantifiseringsion 209 med matriksblind M-prøve.

Det kan konkluderes med at metoden var god for kvantitativ analyse av ketoprofen, med en lineær respons og nøyaktighet som er bedre enn det satte kravet. I tillegg var presisjonen god. Det faktum at R^{PO} og R^{MS} var tilnærmet likt for S-prøvene og M-prøvene, viser at dSPE-steget ikke påvirker ketoprofen. dSPE-steget eliminerte heller ikke matrikskomponenter som påvirket legemiddelet. Det burde arbeides videre med å få minket matrikseffekten ytterligere.

Det ble ikke observert noen tydelige forskjeller i presisjon, nøyaktighet eller R^2 -verdi for ketoprofen sine to ioner. 209-ionet hadde imidlertid noe høyere sensitivitet, og det tidligere valget om å benytte dette som et kvantifiseringsion ble dermed bekreftet.

Koffein

Som tidligere nevnt, ble det oppdaget for sent at flere av legemidlene som eluerte ut i starten av kromatogrammet viste en svært stor båndspredning. Dette gir stor usikkerhet når det gjelder kvantitativ bestemmelse av de legemidlene dette omhandlet. Koffein var et av disse legemidlene. Koffein viser en tydelig hale før legemiddeltoppen i ren standard, mens toppen i utløpsvannmatriks viser en ekstra topp, overlappende med legemiddeltoppen. Årsaken til dette er ukjent. Dette er illustrert i Figur 4-16. En kvantitativ bestemmelse av legemiddelkonsentrasjonen ble derfor ikke utført. Legemiddelet ga imidlertid et areal tydelig forskjellig fra 0, og metoden var derfor egnet for kvalitativ deteksjon av koffein i avløpsvannprøver. Arealene, hvor toppene er integrert innenfor et fast tidsintervall, er oppgitt i Vedlegg A.



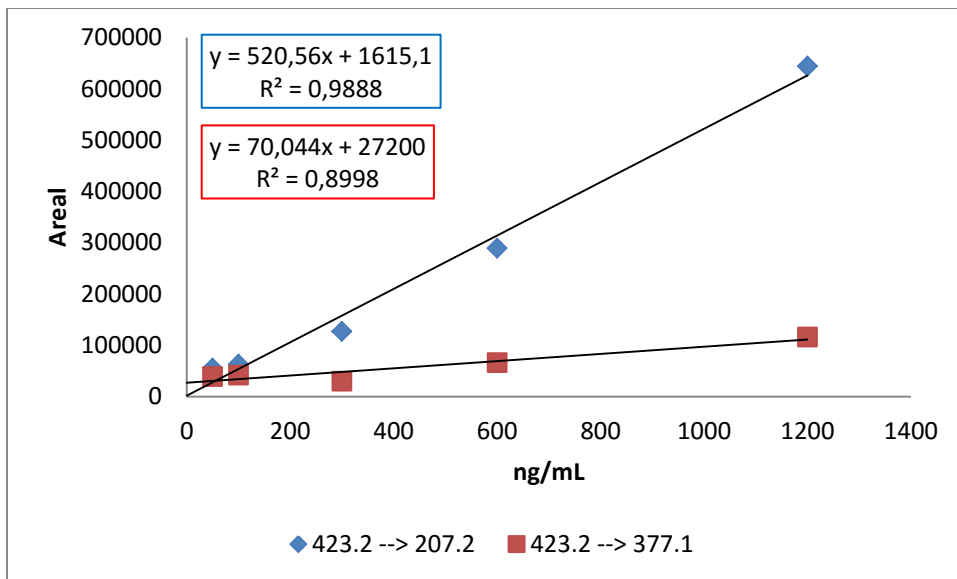
Figur 4-16 Toppene for koffein i ren standard (venstre) og i utløpsvannmatriks (høyre).

Losartan

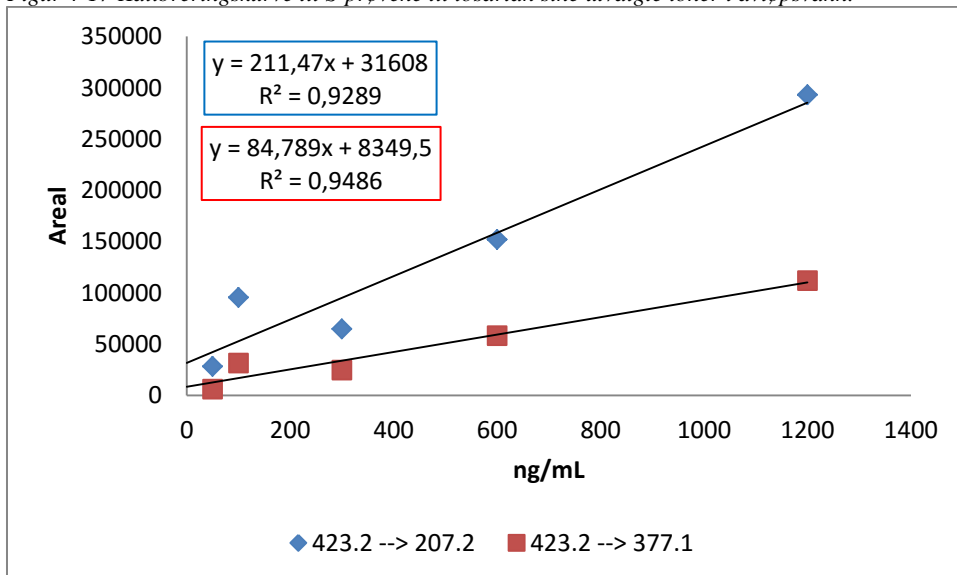
Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til losartan er gitt i Tabell A 66 og Tabell A 67, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 68.

Losartan viste generelt sett svært lave R^2 -verdier, noe som indikerer en dårlig linearitet for legemiddelet. R^2 -verdiene var henholdsvis 0,989/0,929 for kvantifiseringsionet sine S- og M-prøver, og 0,900/0,949 for konfirmeringsionet. S-prøven til kvantifiseringsionet skilte seg her ut med en langt høyere R^2 -verdi sammenlignet med de tre andre tilfellene. Dette ble også bekreftet av F-verdiene som var på henholdsvis 266/39 for kvantifiseringsionet, og 27/55 for konfirmeringsionet. Videre viste responsfaktortesten en RSD på 37,3 % for S-prøven til kvantifiseringsionet, og mellom 69,2 - 114 % i de tre andre tilfellene. Dette indikerer en dårlig korrelasjon mellom respons og konsentrasjon. I alle tilfellene var avviket på måleområdet større enn 5 % og for S-prøvene ga konfirmeringsionet 377.1 et 95 % konfidensintervall med skjæringspunktet med Y-aksen som ikke inkluderte 0.

Kalibreringskurvene til S- og M-prøvene for losartan, se Figur 4-17 og Figur 4-18, viser en indikasjon på at prøvene med en konsentrasjon ≤ 100 ng/mL ligger utenfor det lineære området. En endring i konsentrasjonen i nevnte prøver for S-prøvenes kvantifiseringsion førte ikke til noen endring i respons. For M-prøvene, både for konfirmeringsion og kvantifiseringsion, førte dette til en økning i respons som ikke korrelerte med den lineære trenden ved høyere konsentrasjoner. Under responsfaktortesten ga også nevnte prøver en responsfaktor som var fravikende fra de resterende prøvene i linearitetsrekken. Denne effekten ble ikke observert under arbeid med rene standarder, se Figur A 4. Om prøvene ved 50 og 100 ng/mL ekskluderes, inneholder linearitetsrekka kun 3 punkter for losartan, noe som er for lite til at regresjonslinjen kan benyttes til kvantifisering. Under videre arbeid må en linearitetsrekke inneholdende flere punkter mellom 100 - 1200 ng/mL opparbeides, for å bedre kunne si noe om losartan sin oppførsel i avløpsvannmatriks, og om metoden er egnet for kvantifisering i nevnte konsentrasjonsområde.



Figur 4-17 Kalibreringskurve til S-prøvene til losartan sine utvalgte ioner i avløpsvann.



Figur 4-18 Kalibreringskurven til M-prøvene til losartan sine utvalgte ioner i avløpsvann.

Den relative ioneintensiteten for losartan sine S-prøver viste et avvik på 68,8 %, noe som er høyere enn det tillatte, se Tabell A 110. Avviket for M-prøvene var derimot på 16,0 %, og dermed innenfor akseptabelt avvik. For S-prøvene viste 50 ng/mL og 100 ng/mL prøven en langt høyere relativ ioneintensitet enn de andre prøvene. Dersom disse verdiene ekskluderes, minker det relative standardavviket til 12,0 %.

Tabell A 111 viser en RSD mellom, 5,5 - 15,6 % for kontrollprøvene over 2 nivå. Det var ingen forskjell i observert RSD mellom de to konsentrasjonene, men lavest RSD ble generelt sett for kvantifiseringsionet. Til tross for at M-prøven til konfirmeringsionet ga et avvik over

grensen på 15 % for kontrollprøvene ved 600 ng/mL indikerer dette en tilfredsstillende presisjon i metoden.

Tabell A 70 og Tabell A 71 viser en tydelig nedgang i areal for losartan sitt kvantifiseringsion i M-prøvene sammenlignet med S-prøvene. Gjennomsnittet i S-prøvene ved kontrollprøvene på 600 ng/mL lå på 289 295, og gjennomsnittet i M-prøvene lå på 144 536. I begge disse tilfellene var arealet langt under det arealet som fremkom i ren standard med samme konsentrasjon. Nedgangen i areal indikerer tap av losartan under dSPE-steget. Videre ble det observert en nedgang i arealet for konfirmeringsionet, men den prosentvise nedgangen var imidlertid langt mindre. Dette indikerer at matriksen påvirket de to ionene i ulik grad.

Beregnet R^{MS} og R^{PO} varierte svært mye for de to ionene. For kvantifiseringsionet lå R^{MS} på henholdsvis 18,7 % i S-prøvene og 24,5 % i M-prøvene. Konfirmeringsionet viste derimot en R^{MS} på 38,4 % i S-prøvene, og på 113,3 % i M-prøvene. Alle resultatene, unntatt M-prøven til konfirmeringsionet, indikerer at matriksen førte til en ionesuppresjon. Kromatogrammet for ionesuppresjonstesten for kvantifiseringsionet, se Figur 4-19, viser ingen suppresjon av legemiddelsignalet ved analyttoppen. Testen støtter derfor ikke oppunder effekten vist under HPLC-MS/MS analysen. Konfirmeringsionet ga samme kromatogram under ionesuppresjonstesten, noe som tilsier at matriksen påvirket de to ionene i samme grad.



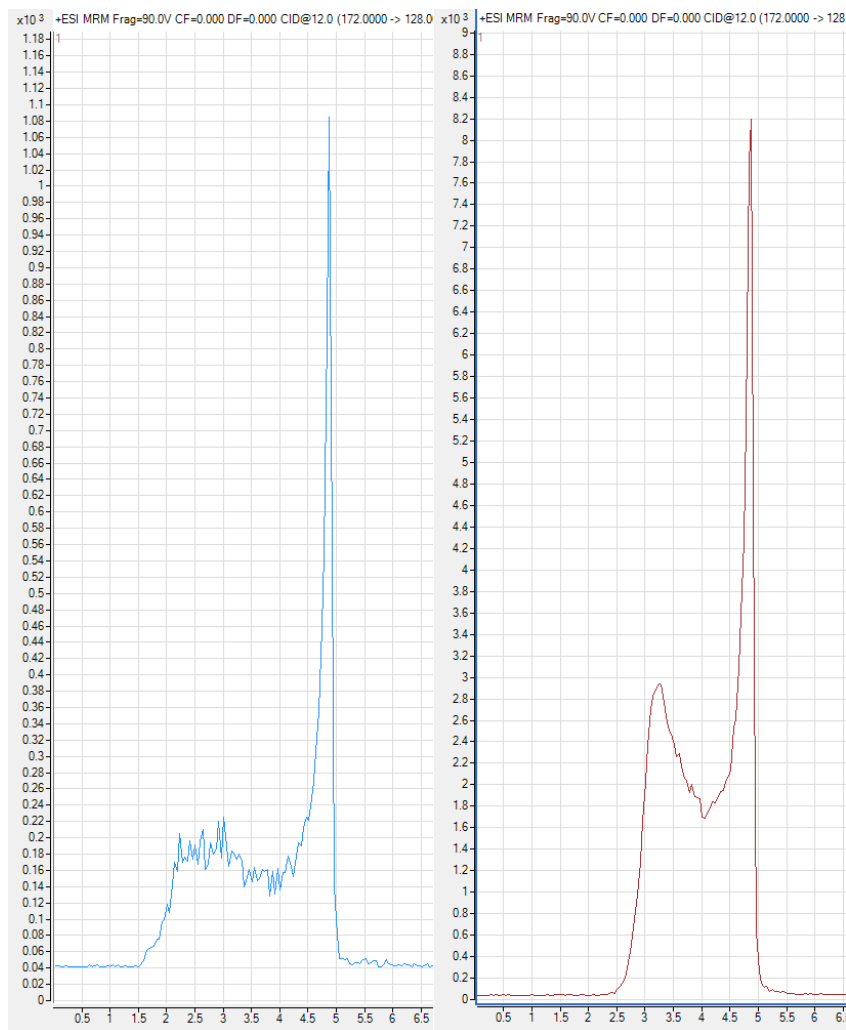
Figur 4-19 Kromatogrammet opparbeidet ved ionesuppresjonstest med losartan sitt kvantifiseringsion 207.2 mot matriksblind M-prøve

R^{PO} er tydelig lavere for kvantifiseringsionet i M-prøvene enn i S-prøvene. R^{PO} ligger på ca. 269 % i S-prøvene, og på ca. 102 % i M-prøvene. For konfirmeringsionet ble det observert samme trend, men med helt andre verdier. Der lå R^{PO} på ca. 123 % i S-prøvene og på ca. 34 % i M-prøvene. Den spikede matriksblinden var årsaken til de store variasjonene. For S-prøvene viste den spikede matriksblinden et areal på ca. $\frac{1}{3}$ av arealet til kontrollprøvene. I M-prøvene viste den spikede matriksblinden et areal i samme størrelsesområde som for kontrollprøvene. For konfirmeringsionet lå arealet til S-prøvene i samme størrelsesområdet som for kontrollprøvene, mens arealet til M-prøve lå nesten 3 ganger høyere. Da arealene for kontrollprøvene over 2 nivå viste en tilfredsstillende presisjon, indikerer resultatene at usikkerheten hovedsakelig lå i arealet til spiket matriksblind. På grunn av denne usikkerheten, kan det imidlertid ikke sies noe sikkert vedrørende matrikseffekten og gjenfinning i prøveopparbeidelsen.

Da for få av prøvene ga respons innenfor linearitetsområdet til losartan, kan ikke metoden slik den er nå benyttes for kvantitativ analyse av legemiddelet. Metoden er imidlertid egnet for kvalitativ analyse, da arealet er tydelig forskjellig fra 0. For å få et bedre overblikk over legemiddelets oppførsel i avløpsvann, bør det under videre arbeid opparbeides flere punkter mellom 100 ng/mL og 1200 ng/mL i linearitetsrekken. Videre bør det studere flere produksjoner. Dette fordi den prosentvise gjenfinningen for de to ionene i S- og M-prøvene var ulik, noe som indikerer at matriksen påvirket ionene i ulik retning. På grunn av dette vil ikke valg av kvantifiseringsion, utover valget tatt om å bruke 207.2 da dette ionet viste best sensitivitet, diskuteres videre.

Metronidazol

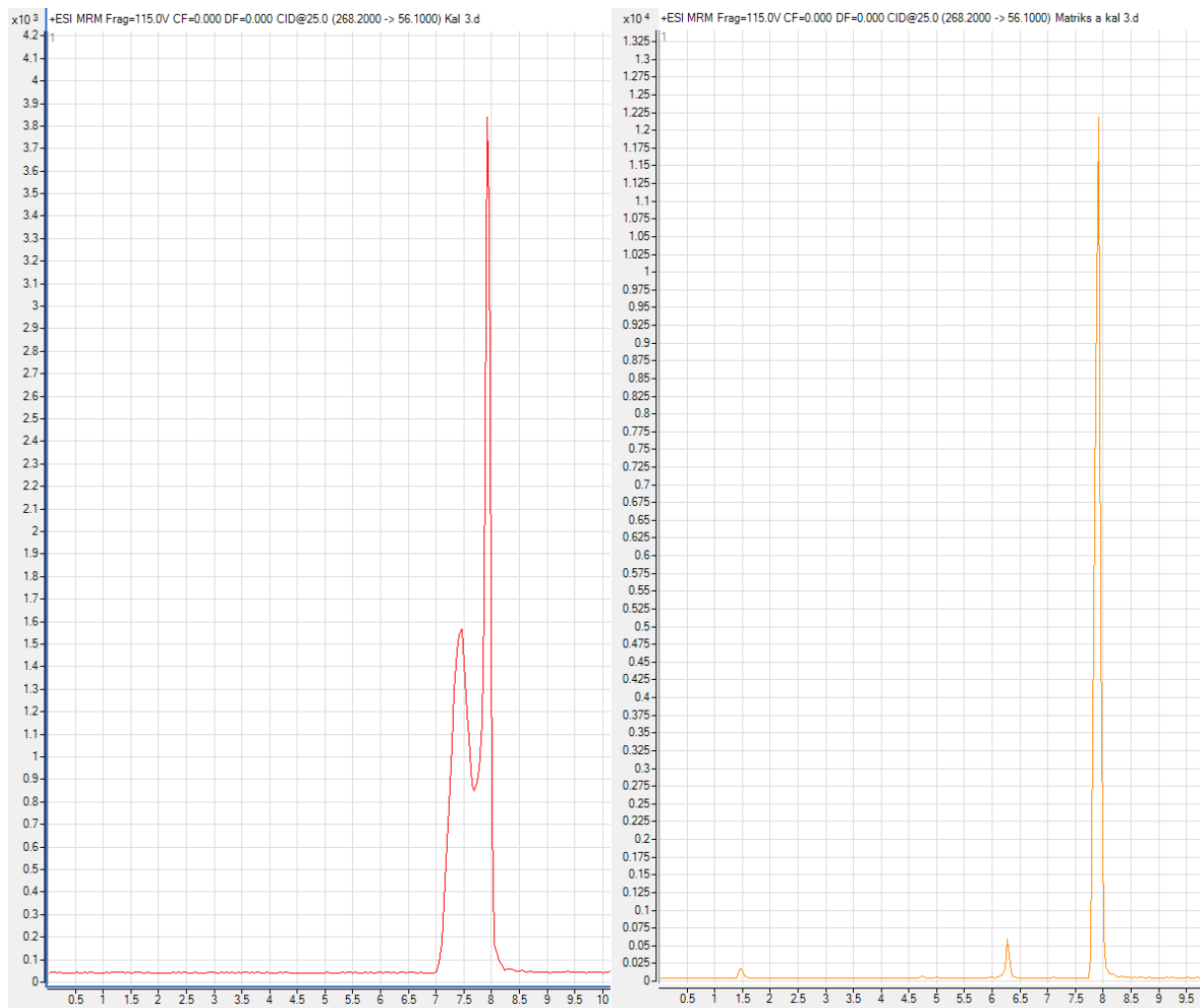
Som tidligere nevnt, ble det oppdaget for sent at flere av legemidlene som eluerte ut i starten av kromatogrammet viste en svært stor båndspredning. Dette gir stor usikkerhet når det gjelder kvantitativ bestemmelse av de legemidlene dette omhandler. Metronidazol var et av disse legemidlene. Toppen viser en tydelig hale før legemiddeltoppen i ren standard, mens toppen i utløpsvannmatriks viser en ekstra topp overlappende med legemiddeltoppen. Årsaken til dette er ukjent. Dette er illustrert i Figur 4-20. En kvantitativ bestemmelse av legemiddelkonsentrasjonen ble derfor ikke utført. Imidlertid ga legemiddelet et areal tydelig forskjellig fra 0, og metoden var egnet for kvalitativ deteksjon av metronidazol i avløpsvannprøver. Arealene der toppene er integrert innenfor et fast tidsintervall, er for metronidazol oppgitt i Vedlegg A.



Figur 4-20 Toppen for metronidazol sitt kvantifiseringsion som ren standard (venstre) og i avløpsvann (høyre).

Metoprolol

For metoprolol viste prøven med ren standard en ekstra topp som overlappet med legemiddeltoppen. Dette var tilfellet både ved standard løst i vann og standard løst i ACN. En slik topp fremkom ikke for metoprolol i utløpsvann, se Figur 4-21. Årsaken til den overlappende toppen for metoprolol i ren standard, ble ikke identifisert. Det kan derfor heller ikke konkluderes med hvorfor den samme toppen ikke fremkom i utløpsvann. Dette medfører usikkerhet i legemiddelets areal, og det ble derfor valgt å ikke kvantifisere metoprololkonsentrasjonen. Toppen gir imidlertid et areal tydelig forskjellig fra 0, og metoprolol kan kvalitativt detekteres i prøven.



Figur 4-21 Toppene for kvantifiseringsionet til metoprolol i ren standard (venstre) og i utløpsvannmatriks (høyre).

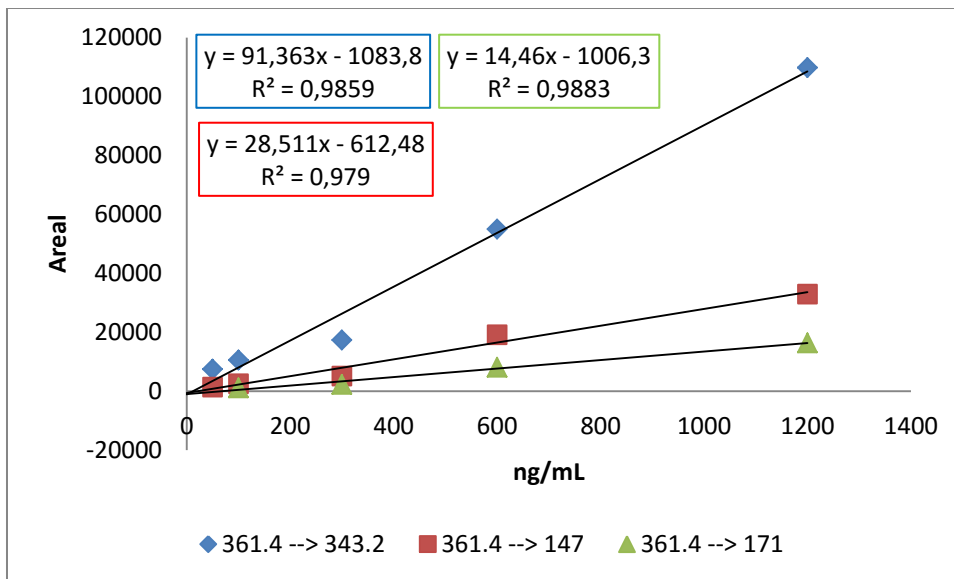
Prednisolon

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til prednisolon er gitt i Tabell A 78 og Tabell A 79, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 80.

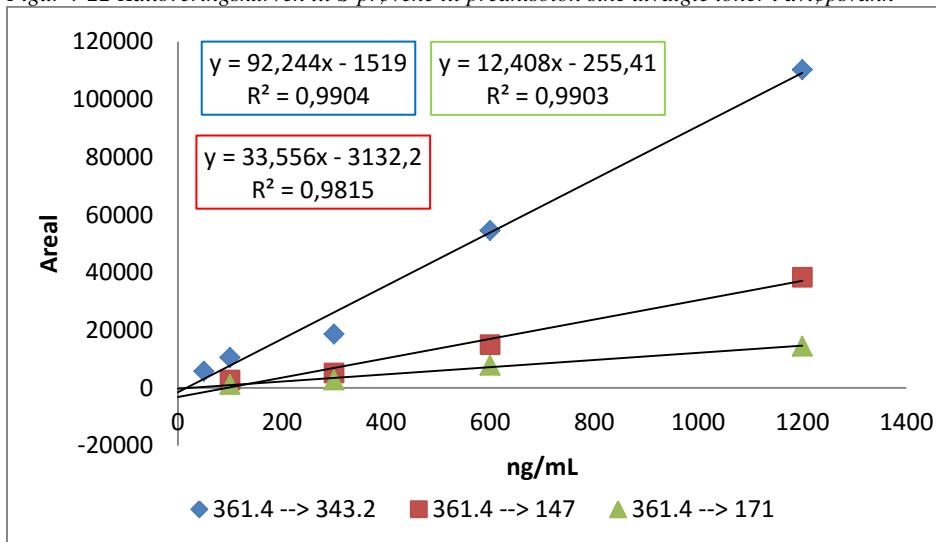
Prednisolon viser en relativt høy LOQ, se Tabell A 108, Vedlegg A. På grunn av dette, ga kun 4 av prøvene kvantifiserbare resultater for begge konfirmeringsionene i M-prøvene og for konfirmeringsion 361.4 → 171 i S-prøvene. Til tross for et ønske om minimum 5 punkter i linearitetsrekken til prednisolon, ble det valgt å gå videre med resultatene.

Prednisolon sine R^2 -verdier ligger generelt sett over kravet satt på $\geq 0,980$, noe som indikerer en tilfredsstillende linearitet. R^2 -verdiene var på 0,986/0,990 for kvantifiseringsionet 361.4 → 343.2 sine S- og M-prøver. Konfirmeringsionet 361.4 → 147 sine R^2 -verdier var på 0,979/0,981, og konfirmeringsionet 361.4 → 171 var på 0,988/0,990. Alle F-verdiene er over F-kritisk verdi, og varierer mellom 105 - 310. Dette bekrefter et lineært forhold mellom konsentrasjon og respons med 95 % sikkerhet. Den høyere lineariteten til det ene konfirmeringsionet, indikerer at ionet kan være mer egnet for kvantifisering. På grunn av ionets dårlige sensitivitet i forhold til ionet 343.2, ble det likevel valgt å gå videre ved det tidligere valgte kvantifiseringsionet, 343.2.

Kalibreringskurvene til prednisolon er gitt i Figur 4-22 og Figur 4-23. Kurvene viser lavere respons enn forventet for prøvene ved 300 ng/mL, her spesielt for kvantifiseringsionets S-prøve. De resterende prøvene fordeler seg jevnt rundt trendlinjen.



Figur 4-22 Kalibreringskurven til S-prøvene til prednisolon sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-23 Kalibreringskurven til M-prøvene til prednisolon sine utvalgte ioner i avløpsvann.

95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet med Y-aksen inneholdt for alle legemiddelets ioner verdien 0. Avviket på måleområdet var høyere enn 5 %, noe som indikerer en stor usikkerhet i metodens regresjonslinje.

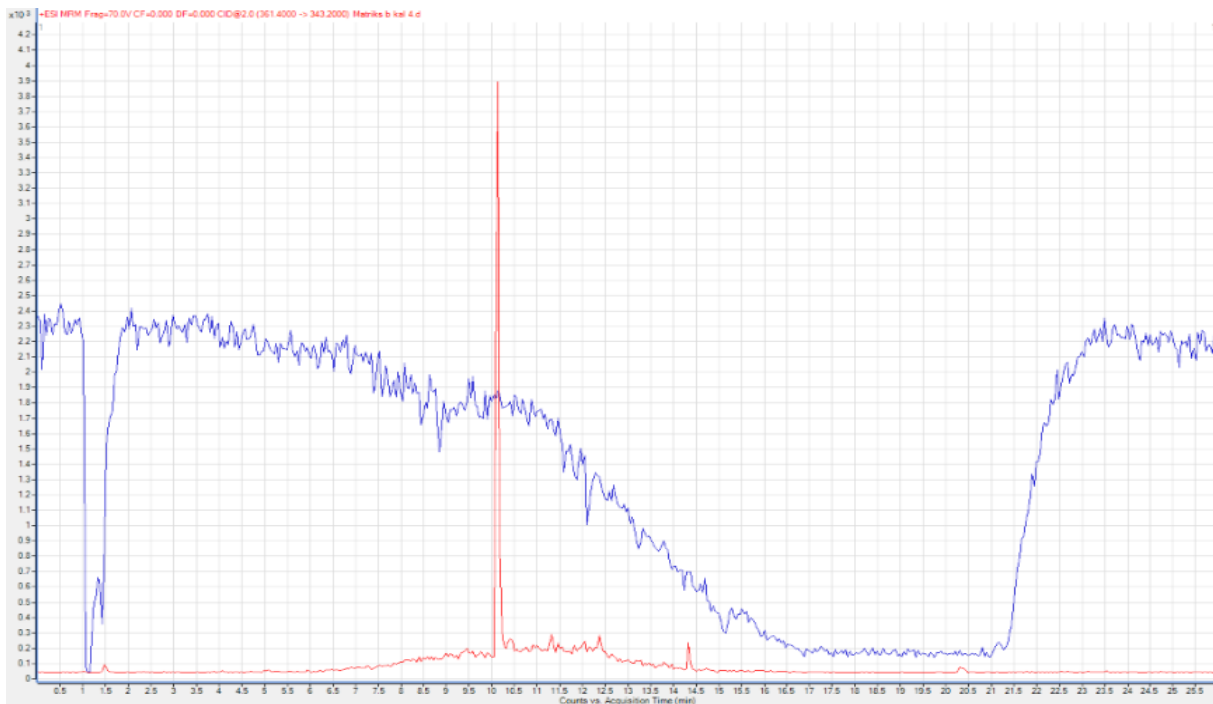
Responsfaktortesten til prednisolon viste en svært høy RSD, mellom 19 - 35 %, der RSD var størst for kvantifiseringsionets M-prøve, se Tabell A 109. Prøven ved 300 ng/mL skilte seg ut med en lavere responsfaktor sammenlignet med de resterende prøvene, dette tydeligst for S-prøvene. Ekskludering av denne prøven ville uansett ikke gitt en RSD for responsfaktortesten innenfor kravet på 15 %, noe som bekrefter den store usikkerheten i forholdet mellom respons og konsentrasjon for prednisolon.

Den relative ioneintensiteten viser en større variasjon enn tillatt for prednisolon sine M-prøver, med en RSD på henholdsvis 46,8 % for 343.2/147, og 41,2 % for 343.2/171. Den relative ioneintensiteten varierer en del over alle konsentrasjonsnivåene for prednisolon, og ingen av prøvene skiller seg ut som en tydelig uteligger.

Tabell A 111 viser at RSD for prednisolon sine kontrollprøver ved 600 ng/mL varierte mellom 13,0 - 30,7 %. For alle, så nær som for en av prøvene, er dette over kravet på 15 %. Dette indikerer en dårlig presisjon ved konsentrasjonsnivå 600 ng/mL. For S-prøvene skilte én av kontrollprøvene seg særlig ut med et lavere areal i forhold til de andre. Samme trend ble ikke observert for M-prøvene. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL lå RSD mellom 18,9 - 24,3 %. Dette indikerer en dårlig presisjon også ved lavere konsentrasjoner.

Prednisolon viser for kontrollprøvene ved 100 ng/mL en estimert konsentrasjon avvikende mellom 29,4 - 42,3 % sammenlignet med reell konsentrasjon. Metodens nøyaktighet er derfor å anse som dårlig i dette området. Ved 600 ng/mL viser prednisolon imidlertid en tilfredsstillende nøyaktighet for S-prøvene med et avvik på 2,48 - 9,26 %, noe som er mindre enn kravet på 10 %. For M-prøvene er avviket imidlertid større; 31,7 % for kvantifiseringsionet, og 13,9 % for konfirmeringsionet 171. Til tross for at M-prøven til konfirmeringsionet 361.4 → 147 viste et avvik på 2,52 %, var ikke nøyaktigheten å anse som tilstrekkelig for M-prøvene.

Tabell A 113 viser at R^{MS} lå mellom 13,9 - 18,0 % for S-prøvene, og 27,7 - 31,0 % for M-prøve. Dette viser at avløpsvannmatriksen fører til en betydelig suppresjon av responsen til prednisolon. Dette stemmer ikke med det resultatet som fremkommer i kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten til prednisolon, se Figur 4-24. Testen viser en nedgang i prednisolon-responsen ved analyttoppen. Nedgangen er imidlertid mindre drastisk i forhold til resultatene ved HPLC-MS/MS analysen. Det er kun gitt kromatogrammet for kvantifiseringsionet, da kromatogrammene opparbeidet for prednisolon sine to konfirmeringsion er like som dette.



Figur 4-24 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av prednisolon sitt kvantifiseringsion 343.2 mot matriksblind M-prøve.

S-prøvene viser en lavere R^{MS} enn M-prøvene. Dette indikerer at noen av de matrikskomponentene som interfererer ved analysen av prednisolon, fjernes under dSPE-steget. R^{PO} lå på ca. 160 % i S-prøvene, og på ca. 60 % i M-prøvene. Videre varierte R^{PO} for de ulike ionene, mellom 57,6 - 84,7 % for M-prøvene, og mellom 144,4 - 166,4 % for S-prøvene. Når matriksblind S-prøve ble spiket ga dette et lavere areal enn for S-prøvene ved samme konsentrasjon. For M-prøvene ga imidlertid spiket matriksblind et høyere areal enn for M-prøvene. Dette indikerer en stor usikkerhet i metoden, og det kan derfor ikke sies noe sikkert om gjenfinningen for prednisolon, verken i prøveoppbeidelsen eller på MSen.

Resultatene indikerer en stor usikkerhet i metoden, og metoden er ikke å anse som egnet for kvantitativ analyse av prednisolon. Arealet er imidlertid tydelig forskjellig fra 0, og metoden er derfor å anse som egnet for kvalitativ analyse av legemiddelet.

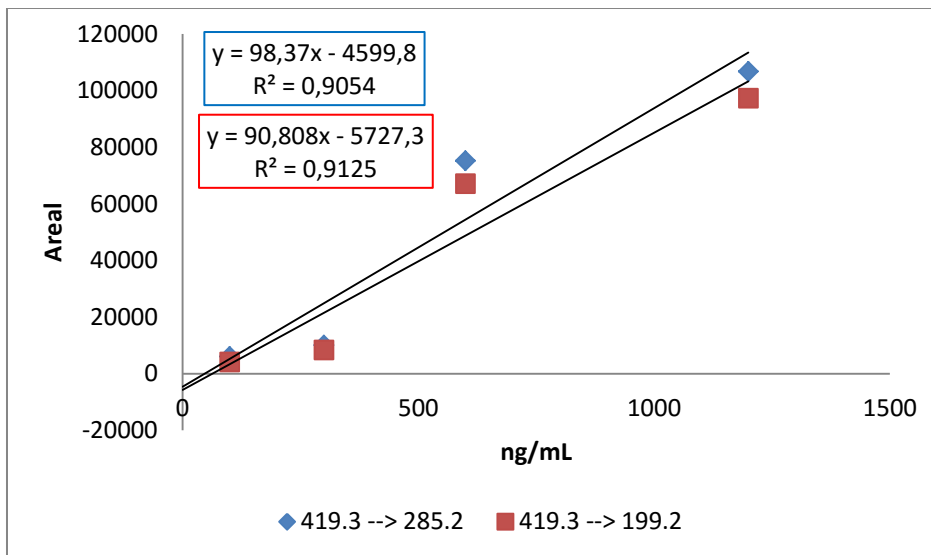
Simvastatin

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til simvastatin er gitt i Tabell A 84 og Tabell A 85, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 86.

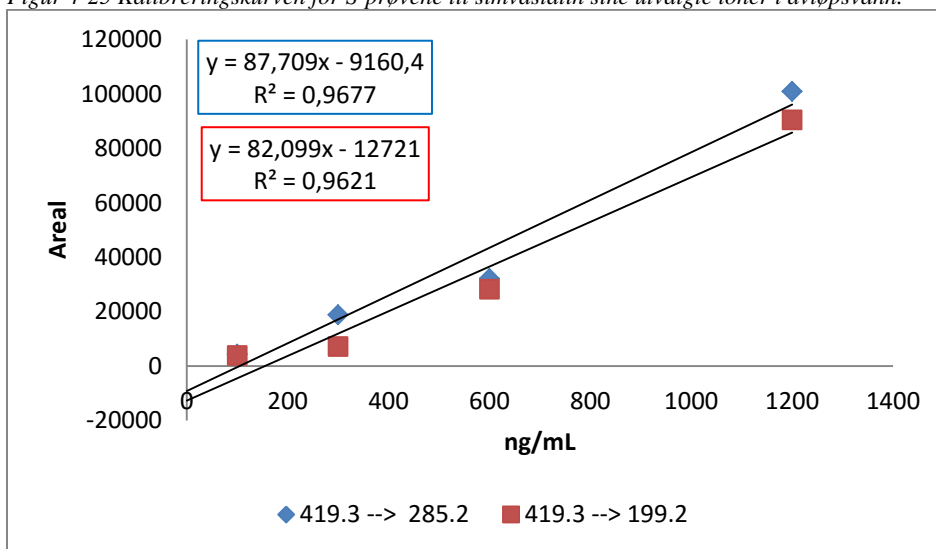
Simvastatin viser en relativt høy LOQ, se Tabell A 108, Vedlegg A. På grunn av dette, ga kun 4 av prøvene kvantifiserbare resultater. Linearitetsrekken inneholdt dermed kun 4 punkter, istedenfor 7 som opprinnelig planlagt. Til tross for et ønske om minimum 5 punkter, ble det valgt å gå videre med linearitetsrekken til simvastatin.

For S-prøvene var simvastatin sine R^2 -verdier lavere enn grensen på $\geq 0,980$. R^2 -verdiene lå på henholdsvis 0,905/0,968 for kvantifiseringsionet 419.3 \rightarrow 285.2 sine S- og M-prøver, og på 0,913/0,962 for konfirmeringsionet 419.3 \rightarrow 199.2. R^2 -verdiene lot seg reflektere i F-verdiene, der disse varierte mellom 19 - 60, Alle F-verdiene var imidlertid høyere enn F-kritisk verdi ved 2 frihetsgrader, 18,51, og det kan derfor med 95 % sikkerhet sies at responsen til simvastatin følger en lineær trend.

Kalibreringskurvene til simvastatin, vist i Figur 4-25 og Figur 4-26, bekrefter den dårlige lineære trenden. S-prøvene viser at resultatene ved 600 ng/mL lå langt høyere enn hva som var forventet i forhold til trendlinjen. Prøven ved 300 ng/mL lå imidlertid langt lavere. M-prøvene viste en annen trend. Her ga prøven ved 100 ng/mL en respons på omtrent halvparten av arealet sammenlignet med 300 ng/mL prøven, mens arealet økte med en faktor på 3 hver gang konsentrasjonen ble doblet. Kvantifiseringsionet viste ikke samme trend, og alle prøvene, så nær som for 600 ng/mL, fulgte trendlinjen godt. Videre lot de varierende trendene seg bekrefte både i responsfaktortesten og i det relative ioneforholdet, der RSD var over tillatt verdi i både S- og M-prøvene. Den svært dårlige lineariteten gir en tydelig indikasjon på at nøyaktigheten i metoden er dårlig, og det kan derfor konkluderes med at metoden ikke er egnet for kvantitativ analyse av legemiddelet. Arealet er imidlertid tydelig forskjellig fra 0, og metoden er derfor egnet for kvalitativ identifikasjon av simvastatin.



Figur 4-25 Kalibreringskurven for S-prøvene til simvastatin sine utvalgte ioner i avløpsvann.



Figur 4-26 Kalibreringskurven for M-prøvene til simvastatin sine utvalgte ioner i avløpsvann.

RSD til kontrollprøvene ved 600 ng/mL lå mellom 38,7 - 50,9 %, og presisjonen var derfor å anse som dårlig. For M-prøvene skilte spesielt én prøve seg ut med et høyere areal i forhold til resten av prøvene. S-prøvene viste et mer varierende areal. Kontrollprøvene ved 600 ng/mL ga imidlertid for S-prøvene et tydelig lavere areal enn prøven ved samme konsentrasjon i linearitetsrekken. Kontrollprøvene ved 100 ng/mL viste et lavere avvik, med en RSD mellom 21,4 - 29,1 %. Presisjonen var imidlertid fortsatt ikke å anse som tilfredsstillende, og usikkerheten i metoden er derfor for stor til at den kan anses som egnet.

Begge ionene viste et tilnærmet lik sensitivitet og lineær oppførsel, og ingen av ionene ga en tydelig bedre presisjon enn den andre. Begge ionene var derfor å anse som like egnet som

kvantifiseringsion. Da metoden ikke var egnet for kvantifisering av legemiddelet, ble ikke videre valg av kvantifiseringsion utført.

Tabell A 113 viser en R^{MS} på ca. 55 % for S-prøvene, og 73 % for M-prøvene. Dette indikerer at avløpsvannmatriksen fører til en ionesuppresjon, og at noen av matrikskomponentene som fører til denne effekt fjernes under opprensningen med PSA under dSPE-steget. Kromatogrammet som ble opparbeidet under ionesuppresjonstesten, viste en svært varierende respons. Dette også før den injiserte matriksblindprøven nåde MSen ved starten av analysen. Kromatogrammet kunne derfor ikke benyttes for å bekrefte resultatet fra HPLC-MS/MS-analysen, se Figur 4-27. Begge ionene viste samme trend.



Figur 4-27 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av simvastatin sitt kvantifiseringsion 285.2 mot matriksblind M-prøve.

For S-prøvene lå R^{PO} på ca. 90 %, noe som indikerer at lite av legemiddelet har gått tapt. For M-prøvene lå R^{PO} på ca. 36 %, noe som indikerer at store deler av legemiddelet tapes under opprensningen med PSA. Som tidligere nevnt er usikkerheten i metoden svært stor, og resultatene gir derfor kun en indikasjon. R^{PO} stemmer ikke overens med resultatene observert under arbeidet med rene standarder og PSA, se avsnitt 4.1.4. Videre har ikke simvastatin noen tilgjengelige syregrupper, se Tabell A 1, og det er derfor ikke forventet at det skal forekomme noen reaksjon med PSA. Det er heller ikke funnet noen studier som støtter opp om dette resultatet.

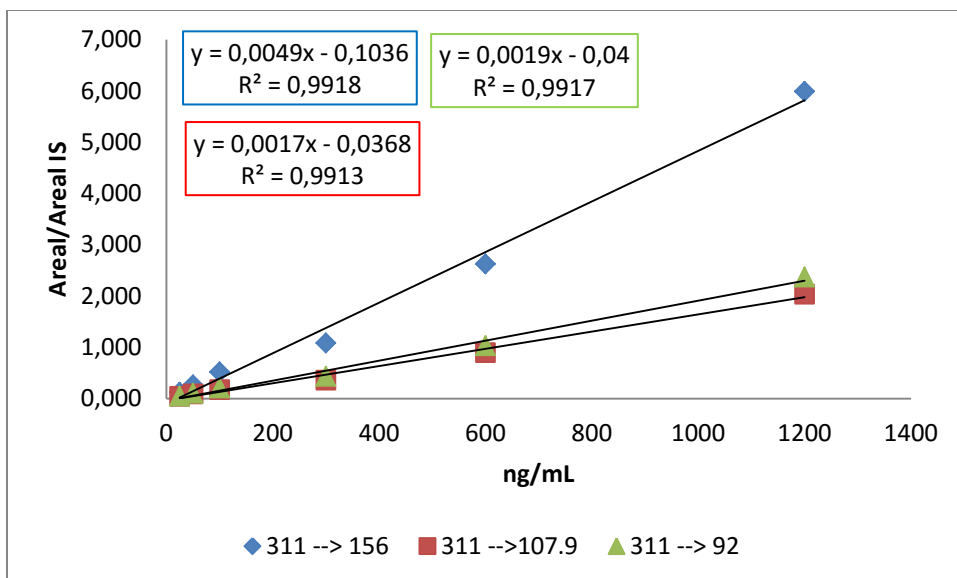
På grunn av den dårlige lineariteten og den svært dårlige presisjonen, er ikke metoden å anse som egnet for kvantitativ analyse av simvastatin. Metoden er imidlertid egnet for kvalitativ analyse, da arealet er tydelig forskjellig fra 0. Videre indikerer resultatene at videre arbeid bør inkludere en optimalisering av dSPE-steget, da resultatene gir en indikasjon om at sorbenten interagerer med legemiddelet. Metodens usikkerhet er imidlertid for stor til at dette kan sies med sikkerhet.

Sulfadoxin

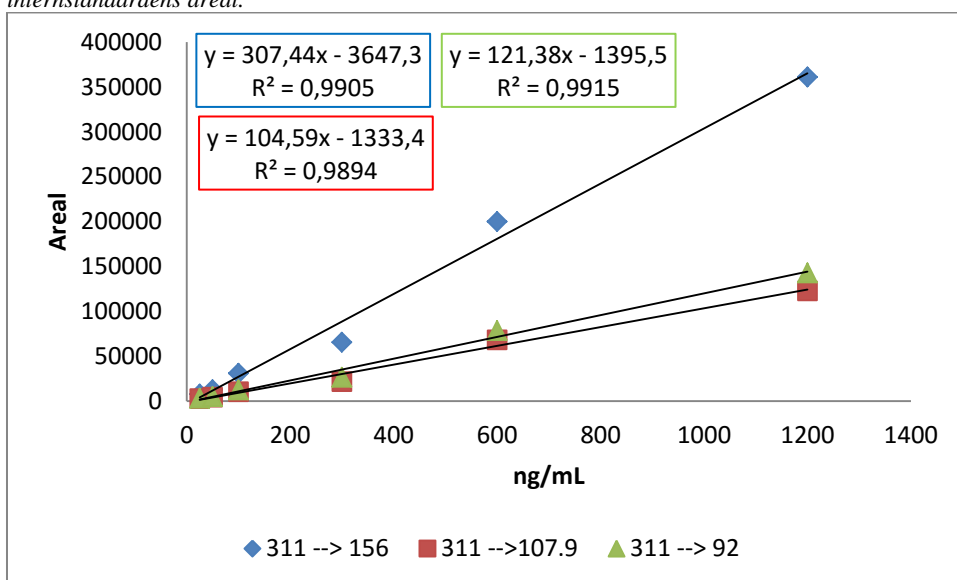
Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til sulfadoxin er gitt i Tabell A 90 og Tabell A 91, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 92.

Sulfadoxin viste R^2 -verdier på over kravet på $\geq 0,980$ for alle sine ioner. R^2 -verdien lå her på 0,990/0,992 for kvantifiseringsionet 311 \rightarrow 156 sine S- og M-prøver, 0,989/0,991 for det ene konfirmeringsionet 311 \rightarrow 107,9, og 0,992/0,992 for det siste konfirmeringsionet 311 \rightarrow 92. Alle ionene viste F-verdier mellom ca. 372 - 524, noe som ga en tydelig indikasjon på et lineært forhold mellom respons og konsentrasjon. Videre var avviket på måleområdet mindre enn 5 % for alle ionene, med unntak av konfirmeringsionet 311 \rightarrow 107,9 sin S-prøve, og 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet inkluderte 0 i alle tilfeller.

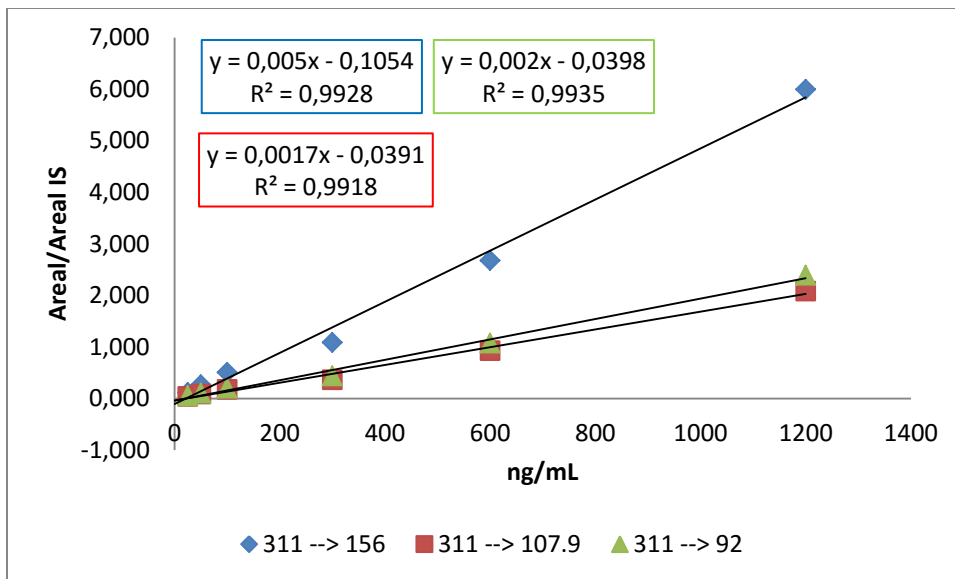
For sulfadoxin ble det observert noe høyere R^2 -verdier når legemiddelets areal ble delt på internstandardens areal, sammenlignet med når legemiddelets areal ble studert alene. På grunn av dette vises både kalibreringskurvene for legemiddelets areal alene og for legemiddelets areal/internstandardens areal. Kalibreringskurvene til sulfadoxin er gitt i Figur 4-28 -Figur 4-31. Det at det er noe bedre linearitet for legemiddelet når arealet blir delt på internstandardens areal, indikerer at internstandardens areal fulgte prøveopparbeidelsen godt. Dette uten de samme tilfeldige feilene som ble observert under kontrollprøvene for internstandardens areal. Differansen i observert R^2 -verdi var imidlertid ikke spesielt stor, og på grunn av de svært varierende verdiene for internstandardens areal under opparbeiding av kontrollprøvene, gir ikke dette godt nok grunnlag for å benytte internstandard under metodevalideringen.



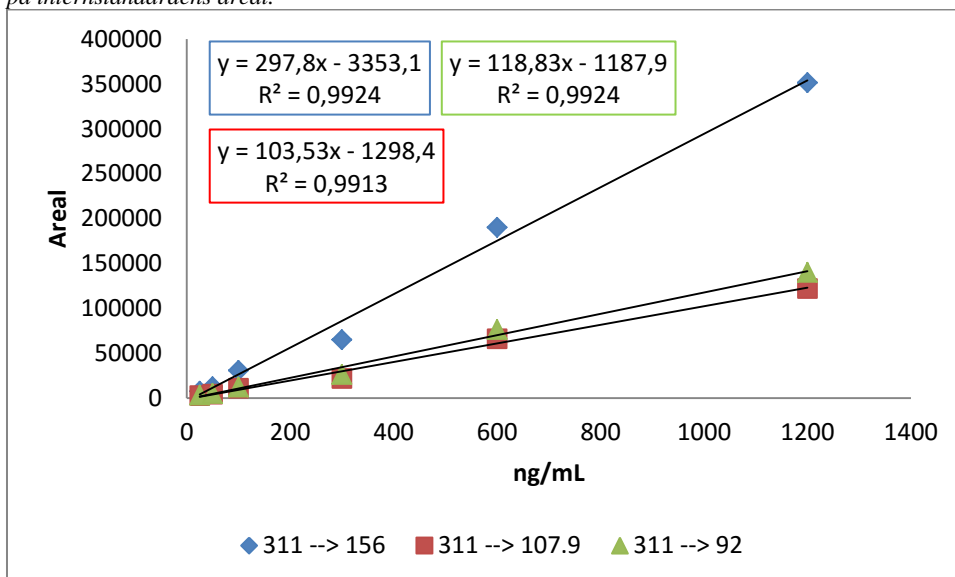
Figur 4-28 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann når legemiddelets areal deles på internstandardens areal.



Figur 4-29 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-30 Kalibreringskurven for M-prøvene til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann hvor legemiddelets areal er delt på internstandardens areal.



Figur 4-31 Kalibreringskurven for M-prøven til sulfadoxin sine utvalgte ioner i avløpsvann.

Tabell A 111 viser et tilfredsstillende standardavvik for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, der RSD lå mellom 10,5 - 13,1 %, noe som var lavere enn kravet på 15 %. En av prøvene skilte seg ut med et lavere areal sammenlignet med de resterende kontrollprøvene. Videre var arealet til prøven som ble benyttet for å opparbeide linearitetsrekke noe høyere. Avviket var imidlertid innenfor kravet som er satt til presisjon. Avviket for kontrollprøvene ved 100 ng/mL var, med en RSD mellom 11,4 - 12,1 %, også innenfor kravet.

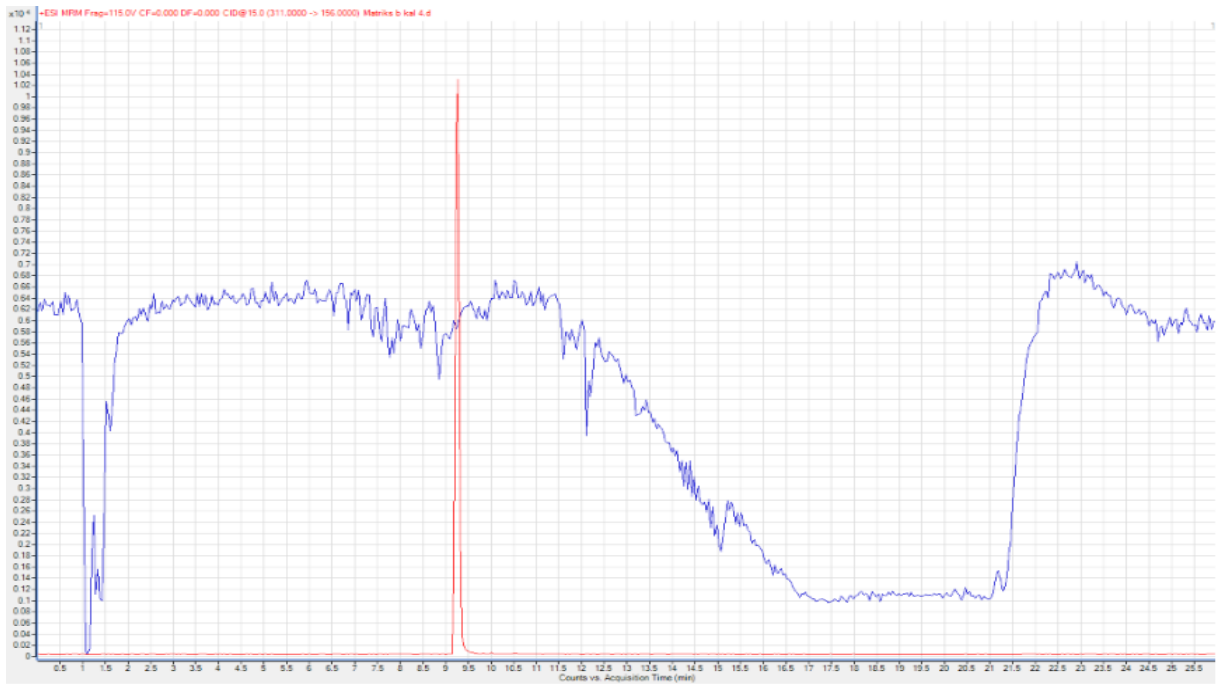
Videre viser både 600 ng/mL og 100 ng/mL prøvene estimerte konsentrasjoner tett opp mot reell konsentrasjon, se Tabell A 112. 600 ng/mL prøvene viste avvik mellom 1,10 - 4,53 %. Dette indikerer en god nøyaktighet i metoden ved bruk av den lineære regresjonslinjen for å

beregne konsentrasjonen i ukjente prøver. Avviket var høyere for 100 ng/mL prøvene, mellom 12,8 - 19,5 %, men dette er fortsatt innenfor kravet satt på ≤ 20 %. Nøyaktigheten var derfor å anse som tilstrekkelig.

Tabell A 113 viser at R^{MS} både for S- og M-prøvene ligger på ca. 23 - 24 %. Dette tyder på at matriksen, både før og etter dSPE, fører til en sterk ionesuppresjon. Dette var imidlertid ikke tydelig i kromatogrammet opparbeidet ved ionesuppresjonstesten, se Figur 4-32, der responsen var relativt jevn ved sulfadoxin-toppen. Det viste kromatogrammet gjelder for sulfadoxin sitt kvantifiseringsion, men konfirmeringsionene viste samme kromatogram. Videre lå R^{PO} over 100 % i alle tilfeller, noe som indikerer at legemiddelet ikke tapes under prøveoppbeidelsen. Arealet for S- og M-prøvene, både ved R^{MS} og R^{PO} , var relativt likt. Dette indikerer at verken legemiddelet eller matrikskomponentene som fantes i prøven lot seg påvirke i stor grad av dSPE-steget. Under arbeidet med rene standarder, indikerte resultatene at sulfadoxin kunne interagere med PSA. Dette til tross for at legemiddelet ikke har noen ledige syregrupper som kan interagere med sorbenten. Resultatene indikerer likevel at dette ikke forekommer ved denne konsentrasjonen PSA.

Metoden er å anse som egnet for analyse av sulfadoxin, da det er observert en god linearitet, god nøyaktighet, tilfredsstillende presisjon over begge de testede nivåene, samt en god gjenfinning i prøveoppbeidelsen. I det videre arbeidet bør det sees på muligheten for å redusere matrikseffekten gjennom en modifisering av dSPE-steget.

Alle utvalgte ioner for sulfadoxin viste en tilnærmet like god linearitet, presisjon og nøyaktighet. Alle ionene var dermed å anse som egnet for sulfadoxin-analyse. Det tidligere valgte kvantifiseringsionet, 156, viste en høyere sensitivitet enn de to andre ionene, noe som støttet bruken av dette til kvantifisering. For konfirmering ble det imidlertid valgt å benytte 107.9, til tross for at det andre ionet også hadde vært egnet.

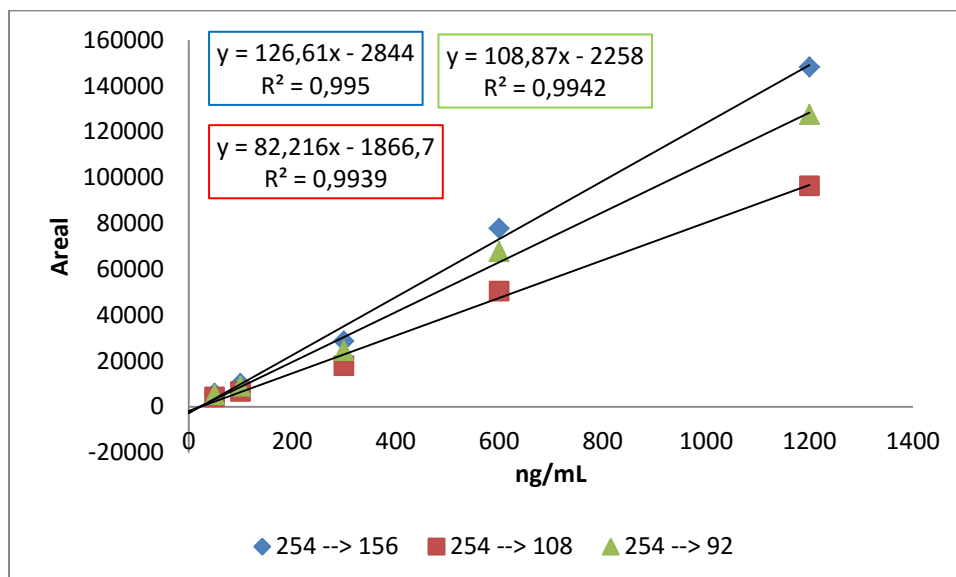


Figur 4-32 Kromatogrammet opparbeidet med en ionesuppresjonstest med matrisblind M-prøve for sulfadoxin sitt kvantifiseringsion 156.

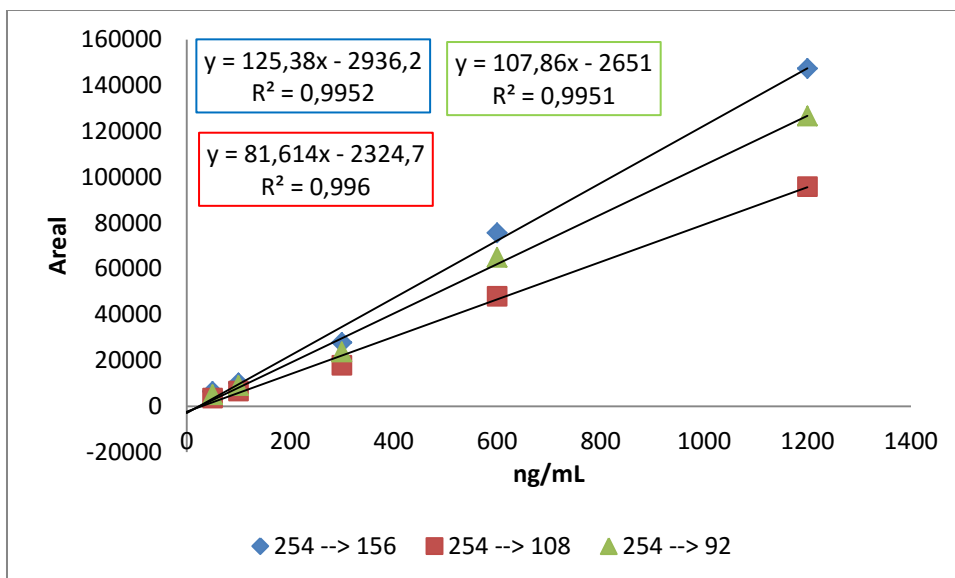
Sulfametoksazol

Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til sulfametoksazol er gitt i Tabell A 96 og Tabell A 97, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 98.

Sulfametoksazol viser en R^2 -verdi for alle ionene som er over kravet satt i H-KL 22 (Kjemilaboratoriet NVH 2010) på 0,990. Kvantifiseringsionet 254 → 156 hadde R^2 -verdier på 0,995 for S-prøvene, og 0,995 for M-prøvene. Konfirmeringsionet 254 → 108 viste 0,994/0,996 og konfirmeringsionet 254 → 92 viste 0,994/0,995. Videre lå F-verdiene mellom 487 - 739, noe som er langt over F-kritisk verdi ved 3 frihetsgrader 10,13, se Tabell 2-1. Begge disse parameterne indikerer et lineært forhold mellom konsentrasjon og respons. Sulfametoksazol sine kalibreringskurver, gitt i Figur 4-33 og Figur 4-34, viser at prøvene fordelte seg jevnt rundt trendlinjen.



Figur 4-33 Kalibreringskurven for S-prøvene til sulfametoksazol sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-34 Kalibreringskurven for M-prøvene til sulfametoksazol sine utvalgte ioner i avløpsvann

Tabell A 98 viser at 95 % konfidensintervallet til alle ionene for skjæringspunktet med Y-aksen inneholdt verdien 0. Videre var avviket på måleområdet, for alle ionene mindre enn 5 %.

Tabell A 111 viser RSD for kontrollprøvene over de to nivåene 600 ng/mL og 100 ng/mL. RSD ved 600 ng/mL lå mellom 4,2 - 6,8 %. Dette indikerer en god presisjon i metoden. Kontrollprøven viste imidlertid generelt sett noe lavere areal sammenlignet med prøven i linearitetsrekken. Videre viste kontrollprøvene ved 100 ng/mL en RSD mellom 10,2 - 13,4 %. Dette indikerer en god presisjon, også ved lave konsentrasjonsnivå.

Tabell A 112 viser at estimerte konsentrasjoner i kontrollprøvene ligger tett opp mot reell konsentrasjon, der avvikene lå mellom 1,92 - 5,34 % for kontrollprøvene ved 600 ng/mL, og mellom 3,04– 11,1 % for kontrollprøvene ved 100 ng/mL. Nøyaktigheten i metoden, og bruk av den lineære regresjonslinjen for beregning av konsentrasjonen i en ukjent prøve, er dermed å anse som god ved begge konsentrasjonsnivåene.

Tabell A 113 viser en R^{MS} på ca. 30 % både for M- og S-prøvene, noe som tyder på en kraftig ionesuppresjon. Kromatogrammet som er opparbeidet under ionesuppresjonstesten for sulfametoksazol sitt kvantifiseringsion, se Figur 4-35, viser en svak nedgang ved sulfametoksazol-toppen. Nedgangen er imidlertid ikke stor nok til å kunne støtte resultatene fra HPLC-MS/MS analysen. Kromatogrammene til konfirmeringsionene viser samme trend.

R^{PO} lå mellom ca. 100 - 110 %, noe som indikerer at legemiddelet ikke gikk tapt under ekstraksjonsprosessen. Arealet for S- og M-prøvene var relativt likt, både ved R^{PO} og R^{MS} , noe som indikerer at verken legemiddelet eller matrikskomponentene som fantes i prøven ble tapt under dSPE-steget. Under arbeid med ren standard indikerte resultatene at sulfametoksazol kunne interagere med PSA. Dette til tross for at legemiddelet ikke har noen ledig syregruppe som kan interagere med sorbenten. Resultatene indikerte imidlertid at dette ikke forekom ved denne konsentrasjonen PSA.

Resultatene viser tilstrekkelig linearitet, nøyaktighet og presisjon, og lite av legemiddelet går tapt i prosessen. Det kan dermed konkluderes med at metoden er egnet for kvantitativ analyse av sulfametoksazol. Det burde likevel også her arbeides videre med å optimalisere opprensning under dSPE-steget for å redusere matrikseffekten.

Alle utvalgte ioner for sulfametoksazol viser en tilnærmet like god linearitet, presisjon og nøyaktighet, og alle ionene var derfor å anse som egnet. Det tidligere valgte kvantifiseringsionet, 156, viste en høyere sensitivitet enn de to andre ionene, noe som støttet bruken av ionet til kvantifisering. For konfirmering ble det valgt å benytte konfirmeringsion 92, da dette ionet viste en noe høyere sensitivitet enn 108.

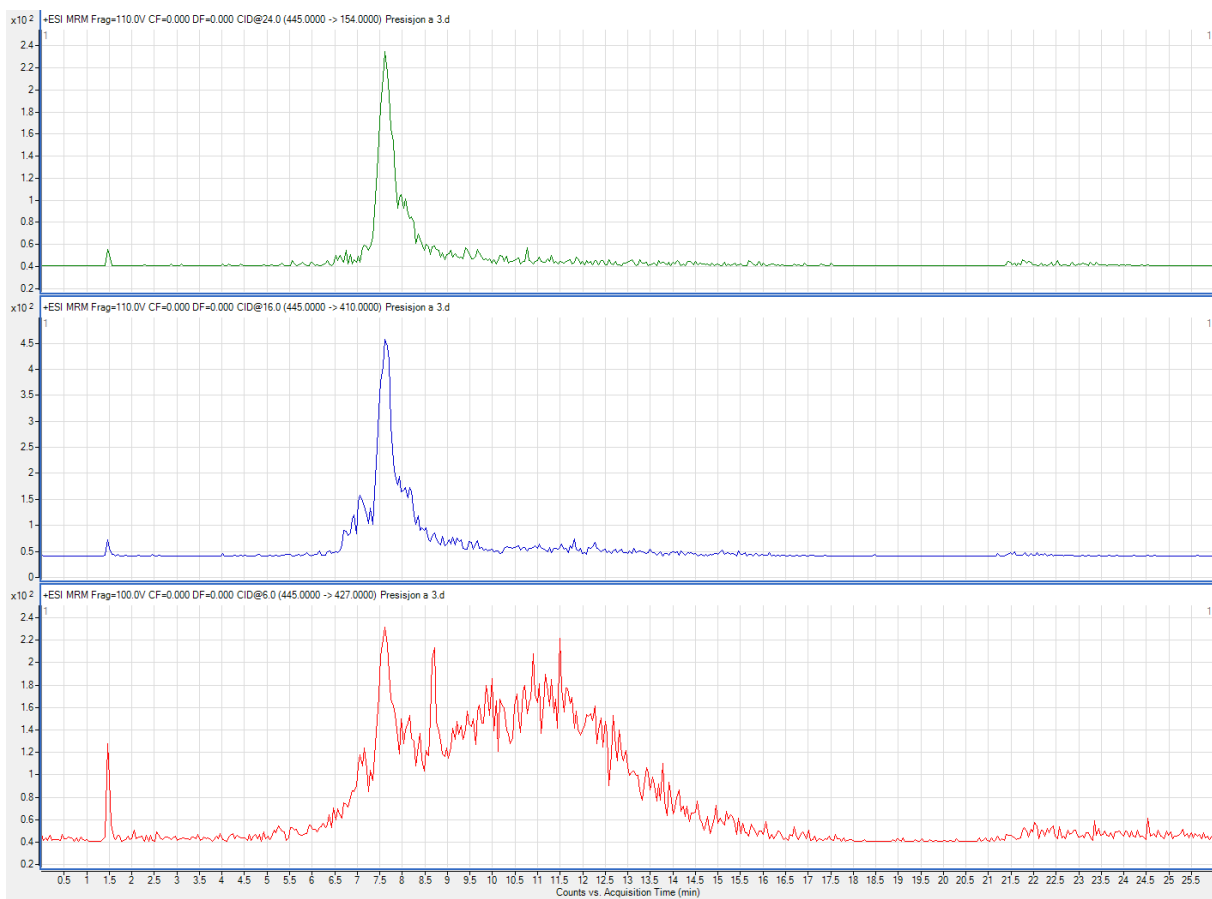


Figur 4-35 Kromatogrammet opparbeidet ved ionesuppresjonstest av sulfametoksazol sitt kvantifiseringsion 156 med matriksblind M - prøve.

Tetrasyklin

Som tidligere nevnt, ble det ved analyseringen av innløpsvannet benyttet en annen kolonne under metodevalideringen enn under optimaliseringen av metoden. Til tross for at spesifikasjonene for kolonnene var like, viste denne kolonnen seg til å være uegnet for analyse av tetrasyklin, og legemiddelet kunne derfor ikke detekteres, se Figur 4-36. På grunn av dette kunne ikke metodens egnethet for kvantitativ analyse av tetrasyklin evalueres.

Den standarden som ble benyttet for tetrasyklin under metodevalideringen ble opparbeidet ny samme dag. Da det kunne skimtes en svak topp ved de høyeste konsentrasjonene, ble det konkludert med at problemet ikke skyldtes degradert legemiddel. Videre lot tetrasyklin seg analysere ved bruk av andre kolonner. Dette gjaldt også for avløpsvann ved tilnærmet like konsentrasjoner.



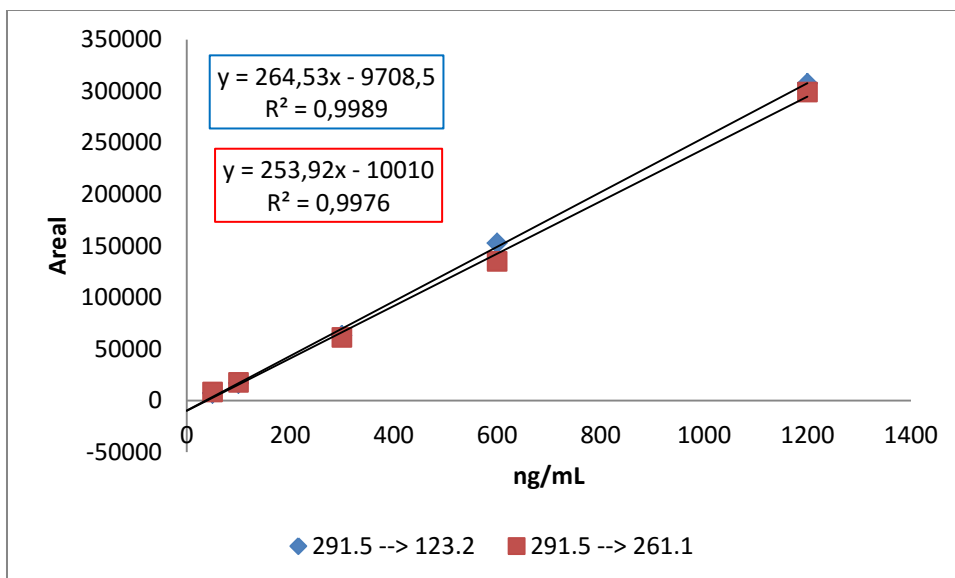
Figur 4-36 Toppene til tetrasyklin sine tre ioner i utløpsvannmatriks spiket til 600 ng/mL.

Trimetoprim

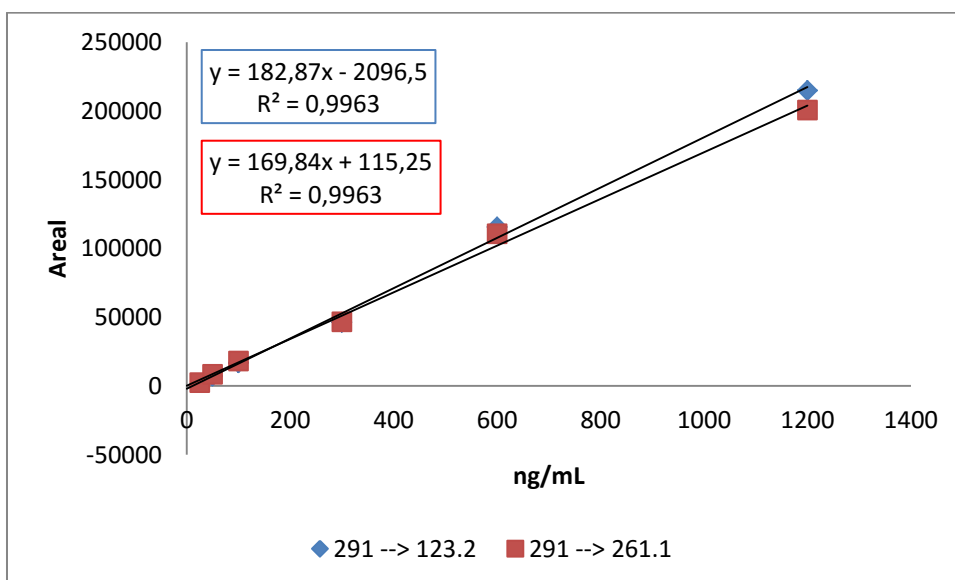
Rådata for linearitetsrekken og kontrollprøvene til trimetoprim er gitt i Tabell A 102 og Tabell A 103, se Vedlegg A. Resultatene oppnådd med LINEST er gitt i Tabell A 104.

Trimetoprim eluerte ut etter ca. 6,82 minutter. Etter ca. 1,5 minutter, det vil si den tiden det tar for mobilfasen å bevege seg gjennom kolonnen, ble det i kromatogrammet observert en topp med MRM-overgangene til trimetoprim, se Figur A 5, Vedlegg A. Dette på samme måte som for ciprofloksacin. Arealet til denne toppen varierte imidlertid mye, og arealet korrelerte ikke nødvendigvis med tilsatt konsentrasjon trimetoprim. Da arealet for toppen etter 7,66 minutter korrelerte med tilsatt konsentrasjon, ble det til tross for den usikkerheten toppen etter 1,5 minutter ga, valgt å gå videre med trimetoprim sine resultater. Dette uten noen form for korreksjon av arealet til prøvene. Årsaken til den ekstra toppen etter ca. 1,5 minutter er ikke identifisert.

Trimetoprim viste generelt sett svært høye R^2 -verdier, noe som indikerer et godt lineært forhold mellom areal og konsentrasjon. Kvantifiseringsionet, 291.5 \rightarrow 123.2 viste R^2 -verdiene 0,999/0,996 for henholdsvis S- og M-prøvene, og konfirmeringsionet viste R^2 -verdier på henholdsvis 0,998/0,996. Dette lot seg videre reflektere i F-verdiene, som varierte mellom 801 - 2 708, noe som tyder på et godt lineært forhold mellom konsentrasjon og respons. Avviket på måleområdet var mindre enn kravet på 5 %, og 95 % konfidensintervallet for skjæringspunktet med Y-aksen inneholdt i alle tilfeller verdien 0. Kalibreringskurvene, se Figur 4-37 og Figur 4-38, viser verdier som ligger jevnt fordelt rundt trendlinjen for begge ionene. Dette både i S- og M-prøvene. De to ionene viste en tilnærmet lik sensitivitet, linearitet, presisjon og nøyaktighet, og begge er dermed å regne som like egnede som kvantifiseringsion. Det ble imidlertid valgt å gå videre med 123.2 som kvantifiseringsion.



Figur 4-37 Kalibreringskurven for S-prøvene til trimetoprim sine utvalgte ioner i avløpsvann



Figur 4-38 Kalibreringskurven for M-prøvene til trimetoprim sine utvalgte ioner i avløpsvann.

Tabell A 109 viser at kvantifiseringsionet til trimetoprim viste en RSD på 18,1 % under responsfaktortesten av S-prøvene, og konfirmeringsionet viste en RSD på 15,9 % for M-prøvene. Prøven med konsentrasjon nærmest LOQ var årsaken til dette høye standardavviket, og i begge tilfellene ga denne prøven en lavere responsfaktor sammenlignet med de resterende prøvene.

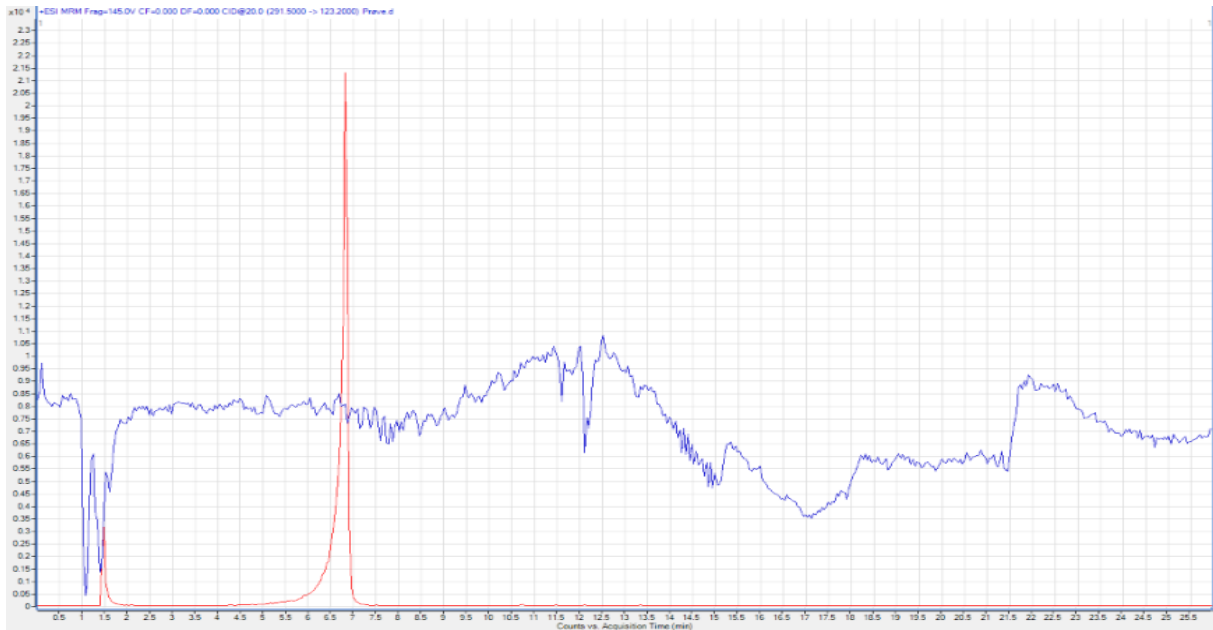
Tabell A 111 viser at RSD for kontrollprøvene ved 600 ng/mL lå mellom 5,4 - 10,5 % for trimetoprim. Presisjonen var å anse som tilfredsstillende. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL var imidlertid avviket større, og RSD lå på henholdsvis 17,7 og 16,8 % for kvantifiserings- og

konfirmeringsionet. Presisjonen var derfor ikke å anse som tilfredsstillende ved så lave konsentrasjoner.

Til tross for at R^2 -verdien indikerte et svært godt lineært forhold mellom areal og konsentrasjon, lå estimert konsentrasjon i kontrollprøvene ved 600 ng/mL mellom 11,6 - 16,3 % fra reell konsentrasjon ved S-prøvene. Dette var som forventet, da Tabell A 102 viser et gjennomsnittlig lavere areal for kontrollprøvene ved 600 ng/mL sammenlignet med arealet i den prøven som ble benyttet for å opparbeide linearitetsrekken. For M-prøvene lå imidlertid estimert konsentrasjon kun mellom 3,59 - 4,62 % fra reel konsentrasjon, og for M-prøvene var riktigheten i metoden å anse som god. For kontrollprøvene ved 100 ng/mL lå estimert konsentrasjon mellom 3,52 - 9,01 % fra reell konsentrasjon, og riktigheten i metoden var også her å anse som tilfredsstillende. Metoden var derfor, til tross for den noe dårlige presisjonen, å regne som egnet for kvantitativ analyse av trimetoprim, også ved lave konsentrasjonsnivå.

Tabell A 113 viser at R^{MS} for trimetoprim lå mellom 120 - 150 %. R^{MS} var generelt noe høyere for kvantifiseringsionet, 291.5 \rightarrow 123.2, og høyere for S-prøvene enn for M-prøvene. Førstnevnte kan indikere at de to ionene påvirkes ulikt av matriksen. Dette lot seg imidlertid ikke bekrefte gjennom ionesuppresjonstesten, da begge ionene ga tilnærmet like kromatogram. Til tross for dette ble det konkludert med at metoden var å anse som like godt egnet for begge ionene til trimetoprim.

For M-prøvene var R^{MS} nærmere 100 %, mens den var høyere for S-prøvene. Dette gir en indikasjon på at dSPE-steget fjerner noe av matrikskomponentene som medfører matrikseffekten for trimetoprim. Matrikskomponentene førte til en økning i respons for trimetoprim. Dette lar seg imidlertid ikke bekrefte ved hjelp av kromatogrammet fått under ionesuppresjonstesten, se Figur 4-39. I kromatogrammet kan det skimtes en svak nedgang rundt elueringstiden, istedenfor en økning, selv om dette var forventet på grunnlag av resultatene på HPLC-MS/MSen. Konfirmeringsionet gir et likt kromatogram.



Figur 4-39 Kromatogrammet opparbeidet under ionesuppresjonstesten av trimetoprim sitt kvantifiseringsion 123.2 med matriksblind M-prøve.

Videre ligger R^{PO} mellom 60 - 70 %. Dette forteller at ca. 30 - 40 % av trimetoprim i den opprinnelige prøven forsvinner under ekstraksjonsprosessen. Det faktum at R^{PO} i S- og M-prøve er tilnærmet likt, viser at trimetoprim ikke forsvinner under dSPE-steget.

Resultatene indikerer at metoden er egnet for analyse av trimetoprim ved bruk av M-prøvene. Denne ga en god linearitet og nøyaktighet, samt en tilfredsstillende presisjon. Årsaken til den ikke-tilfredsstillende gjenfinningen for S-prøven er ukjent, noe som tilsier at det er en usikkerhet i metoden. Det bør derfor arbeides videre for å finne hvilke steg i metoden der trimetoprim tapes, for deretter å modifisere disse. En videre modifisering av dSPE-steget bør også utføres for å redusere matrikseffekten.

Usikkerhet i metoden

Kun 3 av de 15 legemidlene, samt sulfadoxin, lot seg kvantitativt analyseres med en tilfredsstillende linearitet, nøyaktighet og presisjon ved bruk av metoden. På grunn av problemer med kromatografien og interferenser i standardene og matriks, kunne ikke metodens egnethet vurderes for acetylsalisylsyre, koffein, metoprolol, losartan og tetrasyklin.

Metoden var ikke å anse som egnet for analyse av verken amlodipin, benzylpenicillin, ciprofloksacin, ibuprofen, losartan, prednisolon og simvastatin. Metodens egnethet kunne ikke vurderes for ibuprofen og losartan, da det ble analysert for få prøver innenfor deres linearitetsområde. Videre var usikkerheten i metoden svært stor for simvastatin, ciprofloksacin og benzylpenicillin, da det ble observert en dårlig linearitet og presisjon. For amlodipin fremkom det stor usikkerhet for M-prøvene, mens presisjonen var bedre for S-prøvene. Losartan og prednisolon viste svært stor usikkerhet i forbindelse med spiket matriksblind, noe som medførte at gjenfinningen ikke kunne vurderes. Presisjonen var å anse som dårlig for prednisolon, ibuprofen og amlodipin.

Det kan være flere årsaker til metodens usikkerhet, og de viktigste er gitt i Tabell 4-9. Samme tabell er gitt i metodens SOP i Vedlegg A. Tabellens struktur er gitt av Kjemilaboratoriet NMBU (2014).

Tabell 4-9 Viktige faktorer som bidrar til metodeusikkerheten

Handling	Bidrag til usikkerhet
Innveiling / utpipettering	**
Tilsetting av standard og internstandard	***
Homogenisering, ekstraksjon og sentrifugering	**
Overføring av prøve	**
Inndamping og tilsetting av sluttløsemiddel	***
Spin-x og overføring til HPLC-prøveglass	*
Ekvilibrering av HPLC-kolonne og ionekilde	*
Dødvolum i HPLC-oppsettet	**

* lite bidrag til usikkerhet

** middels bidrag til usikkerhet

*** stort bidrag til usikkerhet

Det ble observert en mulig interaksjon mellom PSA og ciprofloksacin, losartan, prednisolon og simvastatin i matriks. Usikkerheten i metoden var imidlertid stor i alle tilfeller, og det kan derfor ikke sies noe sikkert. På grunn av den mulige interaksjonen med PSA, burde det imidlertid analyseres en delprøve av nevnte legemidler før dSPE-steget. Flere av legemidlene viste imidlertid ingen interaksjon med PSA, samtidig som PSA til en viss grad fjernet matrikskomponentene som påvirket legemiddelanalysen. Sistnevnte gjaldt for ciprofloksacin, simvastatin og trimetoprim. For de to førstnevnte er imidlertid usikkerheten i analyseresultatene så stor at det ikke kan sies noe sikkert.

4.3 Avløpsvannprøver

Som nevnt i avsnitt 3.10 ble det analysert 2 feltblinder bestående av Milli-Q vann. Det ble ikke observert en respons for noen av legemidlene med et S/N-forhold over 3, og det kan derfor konkluderes med at feltblindene var frie for disse. Som nevnt i avsnitt 3.9 ble reagensblinden ved en feil opparbeidet uten internstandard under metodevalideringen. Da ingen av legemidlene ble detektert i feltblindene, underbygger dette hypotesen om at alle reagensene var frie for disse.

Det ble analysert 10 prøver á 1 L innløpsvann. En linearitetsrekke over 7 nivå inkludert matriksblind, ble opparbeidet i utløpsvannet for å kvantifisere prøvene. Dette på samme måte som ved metodevalideringen. På dette tidspunktet var ikke resultatene fra metodevalideringen analysert. Det ble tatt som utgangspunkt at store nok mengder av matrikskomponentene ville være fjernet, slik at utløpsvannet ville være egnet til bruk ved kvantifisering av innløpsvannet. Dette viste seg imidlertid å ikke være tilfellet, da det under analysen av utløpsvann og innløpsvann ble observert en svært ulik matrikseffekt. Dette var tydelig for responsen til gjenfinningsstandard, metoprolol-D₇ hydroklorid. Metoprolol viste en overlappende topp under analyse av ren standard løst i Milli-Q vann eller ACN, se avsnitt 4.2. Dette ble ikke observert mens legemiddelet befant seg i utløpsvannmatriksen. På grunn av den overlappende toppen, samt at årsaken til denne var ukjent, ble det ikke foretatt noen kvantifisering. Metoprolol-D₇ viste samme overlappende topp som ble observert for metoprolol. Metoprolol-D₇ viste likevel et svært stabilt areal både i utløpsvannmatriksen og innløpsvannmatriksen. Responsen var derimot ulik.

Før analyse ble foretatt, ble gjenfinningsstandard tilsatt med samme konsentrasjon til alle prøvene. Dette ga et gjennomsnittlig areal på ca. 23 500 i utløpsvannprøvene, og et gjennomsnittlig areal på ca. 13 000 i innløpsvannprøvene. I innløpsvannprøvene fortynnet 1/10, var gjennomsnittlig areal av gjenfinningsstandard ca. 27 500. Dette indikerer en svært ulik matrikseffekt i innløpsvannet og utløpsvannet. Som illustrert i avsnitt 4.2, har matriksen svært varierende effekt på de ulike legemidlene. Noen av legemidlene i utløpsvann viste en tydelig ionesuppresjon, mens andre viste en økning i respons. Videre viste linearitetsrekkene i utløpsvann ulikt stigningstall sammenlignet med stigningstallene for de samme legemidlene under metodevalideringen. Dette indikerer at det er variasjoner i utløpsvannmatriksen

avhengig av hvilket tidspunkt vannet er samlet. På grunn av den svært varierende matrikseffekten ble det konkludert med at det å estimere legemiddelkonsentrasjonen i innløpsvannprøvene ved hjelp av forholdet mellom gjenfinningsstandardens areal i inn- og utløpsvann, ikke var å anse som en egnet metode.

I avsnitt 4.2 ble det også vist at ionesuppresjonstesten i de fleste tilfellene, ga et annet resultat angående matrikseffekt sammenlignet med HPLC-MS/MS-analysen. Kromatogrammene er derfor heller ikke oppgitt. Sammenligning av de to ionesuppresjonstestene utført i ulik matriks, kan derfor ikke benyttes til å estimere konsentrasjonen i innløpsvannprøvene. Legemidlene kan derfor kun kvalitativt identifiseres i innløpsvann. Resultatene viser et tydelig behov for en matrikstilpasset kalibreringskurve i den matriksen som skal analyseres. Dette for å kunne kvantifisere konsentrasjonen i ukjent prøve. Da avløpsvannmatriksen ikke vil være helt lik dersom den tas ut over 2 dager, må en ny kalibreringskurve opparbeides til hver analysedag.

I denne oppgaven ble det satt et krav på et S/N-forhold på over 10 for å kvalitativt kunne si at legemidlene var tilstede i innløpsvannet. Dette nivået ble valgt for å følge det samme kravet som ved kvantitativ analyse av legemidlene. Det var videre satt krav til at den relative ioneintensiteten lå innenfor intervallene gitt i Tabell A 110. Rådata for innløpsvannet til de identifiserte legemidlene, samt målt areal for ikke-spiket utløpsvann og spiket utløpsvann til 25 ng/mL, er gitt Tabell A 114 og Tabell A 115, se Vedlegg A.

Verken metronidazol, prednisolon, benzylpenicillin eller simvastatin kunne kvalitativt identifiseres i innløpsvannprøvene. Nevnte legemidler ga heller ingen respons med et S/N forhold over 10 i utløpsvannprøvene. Disse legemidlene blir derfor ikke diskutert videre.

Ciprofloksacin og tetrasyklin ble heller ikke identifisert i verken innløps- eller utløpsvannprøvene ved et S/N forhold over 10. Det ble likevel benyttet 177 897 definerte døgndoser ciprofloksacin i Oslo og Akershus i 2014 (Reseptregisteret 2016), og 190 478 definerte døgndoser med tetrasyklin. Som tidligere nevnt har tetrasykliner og fluorokinoloner evnen til å danne komplekser med di- og trivalente kationer, og disse vil derfor kunne gjenfinnes i det partikulære materialet i avløpsvannet (Anderson *et al.* 2005; Christian *et al.* 2003; Tolls 2001; Uslu *et al.* 2008). Av den grunn vil legemidlene i liten grad kunne gjenfinnes i vandig fase (Det Norske Veritas & Eurofins Danmark 2006).

De resterende 8 legemidlene lot seg kvalitativt identifiseres i innløpsvannprøvene.

I de 10 innløpsvannprøvene viste ibuprofen et noe varierende areal. Arealet lå normalt mellom 3 - 4 000, og S/N forholdet varierte mellom 10 - 176. Ibuprofen ble derimot ikke identifisert i utløpsvannet, verken i matriksblindprøven eller prøven spiket til 25ng/mL. Dette indikerer at ibuprofen i stor grad elimineres under renseprosessen av avløpsvannet ved VEAS. Dette kan også bekreftes ved studier utført av Thomas *et al.* (2007) og Det Norske Veritas og Eurofins Danmark (2006), hvor det i begge studiene ble benyttet utløpsvann og innløpsvann fra VEAS. I begge studiene ble ibuprofen kvantifisert med mye lavere konsentrasjoner i utløpsvann enn i innløpsvann. Dette viser at renseprosessen av avløpsvannet ved VEAS er med på å fjerne ibuprofen fra avløpsvannet.

Koffein viste et langt høyere S/N forhold for innløpsvannprøvene, ca. 3 000, sammenlignet med utløpsvannprøvene, ca. 15. Dette til tross for at innløpsvannprøvene var fortynnet 1/10. Dette indikerer at koffein i stor grad fjernes under renseprosessen av avløpsvannet ved VEAS. Dette stemmer også med resultatene til Helland (2008), hvor koffein ble kvantifisert ved en svært mye lavere konsentrasjon i utløpsvannet ved VEAS, sammenlignet med det ikke rensede avløpsvannet i Longyearbyen. Det samme gjaldt for analyse av utløpsvannet ved Tromsø, der kun en primær avløpsvannbehandling var gjennomført. Dette uten biologiske rensetrinn.

Innløpsvannprøvene viste en respons for amlodipin med et S/N-forhold på ca. 20. De ikke-spikede utløpsvannprøvene viste dag 1 et S/N forhold under 10. Ved dag 2 var S/N forholdet imidlertid ca. 20. Det er ikke funnet noen kilder i litteraturen som støtter oppunder teorien om at amlodipin degraderes under renseprosessen av avløpsvannet, selv om resultatene opparbeidet ved dag 1 indikerer dette. Derimot viser Santos *et al.* (2013) og i sin studie en tilnærmet lik konsentrasjon av amlodipin i utløpsvann og innløpsvann. Det må tas høyde for at avløpsvannet der var renset med andre metoder enn de som benyttes ved VEAS.

Ketoprofen viste et S/N forhold som var høyere for utløpsvannprøvene sammenlignet med innløpsvannprøvene. Dette indikerer en høyere konsentrasjon av legemiddelet i utløpsvannet enn i innløpsvannet. I en studie utført av Langford og Thomas (2009) ble det ved VEAS detektert høyere konsentrasjoner av ketoprofen i utløpsvannet enn i innløpsvannet, noe som stemmer overens med resultatene i dette forsøket. Ketoprofen skilles ut fra kroppen

hovedsakelig i konjugert form, men disse hydrolyseres raskt. Dette både ved kroppstemperatur, romtemperatur og frossen lagring (Grubb *et al.* 1999; Upton *et al.* 1980). Dekonjugering er trolig årsaken til den økte legemiddelkonsentrasjonen. I en studie utført av Gros *et al.* (2012) ved et avløpsanlegg som benytter aktivt slam under rensesprosessen, er det derimot observert en nedgang i ketoprofenkonsentrasjonen. Legemiddelet ble imidlertid ikke fullstendig eliminert.

Losartan, sulfametoksazol, metoprolol og trimetoprim viste alle areal med et S/N forhold over 10, dette både for utløpsvann og innløpsvannprøvene. Losartan viste tilnærmet likt areal og S/N-forhold for utløpsvann- og innløpsvannprøvene. Sulfametoksazol viste derimot et høyere S/N-forhold og et høyere areal for innløpsvannprøvene. Trimetoprim viste et høyere S/N forhold og areal for utløpsvannprøvene. Metoprolol viste et tilnærmet likt S/N forhold, mens arealet i innløpsvannet var betydelig lavere. Som tidligere nevnt var matriksen svært ulik i de to avløpsvannprøvene, og dette kan være årsaken til differansen i areal og S/N-forhold.

En studie utført av Gros *et al.* (2012) viser en tydelig nedgang i konsentrasjon av alle de fire legemidlene i utløpsvann i forhold til i innløpsvann. Rensemetsoden som ble benyttet var med aktivt slam, noe som ikke benyttes ved VEAS. I en studie utført av Det Norske Veritas og Eurofins Danmark (2006) med prøver hentet fra VEAS, ble ikke sulfametoksazol detektert i innløpsvannet, men ble detektert ved konsentrasjoner fra 0,092 - 0,16 µg/L i utløpsvannet. I en studie utført av Thomas *et al.* (2007), med prøver også hentet fra VEAS, ble sulfametoksazol derimot detektert i en lavere prosentandel av prøvene, og viste generelt lavere konsentrasjoner i utløpsvann enn i innløpsvann. Samme studie viser at konsentrasjonen for metoprolol er i samme størrelsesorden både for innløpsvann og utløpsvann.

Videre ble trimetoprim av Thomas *et al.* (2007) detektert med et gjennomsnittlig høyere konsentrasjonsnivå i innløpsvannet, men der mediankonsentrasjonen var langt høyere i utløpsvannet. I studien utført av Det Norske Veritas og Eurofins Danmark (2006) ved VEAS, ble det for trimetoprim detektert varierende konsentrasjoner i utløpsvann og innløpsvann. En av de dagene da prøvene ble tatt, ble det detektert høyere konsentrasjoner i innløpsvannet, mens det en annen dag ble detektert lavere konsentrasjoner. Da resultatene for innløpsvannprøvene under denne oppgaven ikke kan kvantifiseres, vil ikke losartan, sulfametoksazol, metoprolol og trimetoprim sin påvirkning av rensesprosessen diskuteres videre.

Som tidligere nevnt viste ketoprofen, koffein, losartan, metoprolol, sulfametoksazol og trimetoprim et areal med et S/N-forhold over 10 for de ikke-spikede utløpsvannprøvene. Amlodipin viste ved prøver fra dag 1, et areal med et S/N forhold < 10. Toppen i prøvene opparbeidet dag 2 viste imidlertid S/N forhold > 10. Metodevalideringen viste at kun ketoprofen, sulfametoksazol og trimetoprim kan kvantifiseres i utløpsvannprøvene. Estimert konsentrasjon for M-prøven i utløpsvannet er gitt i Tabell 4-10.

Tabell 4-10 Estimert konsentrasjon i utløpsvannprøvene

Legemiddel	Konsentrasjon i ng/L
Ketoprofen	<30
Sulfametoksazol	0,24
Trimetoprim	0,34

Konsentrasjonen som er estimert er langt lavere enn de konsentrasjonene som er rapportert av Thomas et al. (2007) og Det Norske Veritas og Eurofins Danmark (2006). De estimerte konsentrasjonene ligger i det nedre området i den opparbeidete linearitetsrekken, tett mot LOQ for sulfametoksazol og trimetoprim, og under LOQ for ketoprofen. Da flere av legemidlene viste en høyere LOQ enn de tre nevnte legemidlene, og da ibuprofen og losartan viste et dårlig lineært forhold ved konsentrasjoner ≤ 100 ng/mL, indikerer dette et behov for å i større grad oppkonsentrere avløpsvannet. Dette kan enten gjøres ved å rekonstituere residuet neddampet etter SPE-ekstraksjonen i et mindre volum Milli-Q vann, eller ved å føre mer enn 1 L vannprøve gjennom SPE-kolonnen. Som tidligere nevnt er det ønskelig at QuEChERS ekstraksjonen skal være en rask og enkel metode for å analysere mange ulike analytter. Det å øke mengden avløpsvann som oppkonsentreres på SPE-kolonnen, gir et økt tidsforbruk. Som en følge av dette, vil det være behov for en automatisering av SPE-ekstraksjonen. Det økte tidsforbruket ved å øke vannmengden, og den økte usikkerheten ved å minke volumet residuet løses opp i, tilsier at ingen av disse løsningene er å anse som ideelle

5 Konklusjon

Oppgavens formål var å utvikle en analytisk metode basert på optimalisering av en QuEChERS ekstraksjon, for kvantitativ analyse av 15 utvalgte legemidler innenfor ulike medikamentgrupper i avløpsvann. Det ble benyttet en HPLC-MS/MS (ESI (+)-QQ) under analysen. Metoden var å anse som egnet for analyse for 3 av legemidlene; ketoprofen, sulfametoksazol og trimetoprim. Analyseresultatene til sulfadoxin viste at metoden også var å anse som egnet for analyse av internstandard sulfadoxin-D₃. De 4 legemidlene ga en bedre linearitet, presisjon og nøyaktighet enn kravet på R^2 -verdi $\geq 0,980$, presisjon på $\leq 15\%$, og en nøyaktighet med et avvik mellom reell og estimert konsentrasjon i ukjent prøve på $\leq 10\%$.

Metoden hadde imidlertid flere svakheter, og må derfor optimaliseres videre. En av de største svakhetene var i forhold til kromatografien, der mobilfasesammensetningen ved starten av analysen var lite gunstig for flere av de mest polare analyttene. Dette førte til en stor båndspredning for disse legemidlene. Videre var analysetiden for lang, noe som medførte en dårligere sensitivitet. Linearitetsrekken spente også over et for vidt område, og med for få prøver innenfor konsentrasjonsområdet 100 ng/mL og 1200 ng/mL. Dette, i tillegg til en mulig forurensning som ikke ble identifisert, medførte at metodens egnethet for ibuprofen, losartan, koffein, metronidazol og metoprolol ikke kunne evalueres. Videre var kolonnen som ble benyttet under metodevalideringen svært uheldig for tetrasyklin, og legemiddelet ble ikke detektert. Dette var imidlertid ikke tilfellet når legemiddelet ble analysert ved hjelp av andre kolonner med samme spesifikasjoner. Metodens egnethet for tetrasyklin kunne derfor heller ikke vurderes under metodevalideringen.

Metoden viste svært stor usikkerhet i forhold til analyse av amlodipin, prednisolon og simvastatin, og er derfor å anse som uegnet for kvantitativ analyse av disse legemidlene i avløpsvann. På grunn av interaksjonen mellom ciprofloksacin, tetrasyklin og di- og trivalent metallioner i avløpsvannmatriks, var ikke metoden å anse som egnet i sin nåværende form. Det er imidlertid foreslått endringer i metoden, noe som vil kunne gjøre den egnet for kvantitativ analyse av flere av legemidlene, inkludert ciprofloksacin og tetrasyklin.

6 Videre arbeid

Til tross for at metoden var å anse som egnet for kvantitativ analyse av ketoprofen, sulfadoxin, sulfametoksazol og trimetoprim i avløpsvann, viser metoden flere svakheter.

En av de største svakhetene lå i kromatografien, der mobilfasesammensetningen ved starten av analysen var uheldig for flere av de mest polare analyttene. Dette førte til for liten retensjon og en for stor båndspredning for metronidazol, koffein og acetylsalisylsyre. Sistnevnte legemiddel viste ingen retensjon på kolonnen. For å unngå dette problemet, må det videre arbeidet inkludere en endring i mobilfasesammensetningen og gradienten.

Skanntiden var også for lang. Dette medførte for få avlesninger per topp, og dermed en dårligere reproduserbarhet. Under videre arbeid bør metodens MRM-skann deles inn i segmenter, der det i hvert tidssegment kun søkes etter noen av legemidlene. En annen løsning vil kunne være dynamisk MRM, der det kun søkes etter de ulike legemidlene innenfor et gitt retensjonstidsvindu (Stone *et al.* 2009).

Videre ble det observert en varierende R^{MS} for prednisolon, losartan og trimetoprim sine kvantifiserings- og konfirmeringsioner. Dette indikerer at matriksen påvirker de ulike ionene i ulik grad. I videre studier bør det jobbes med å finne produksjon som lar seg påvirke i lik grad av avløpsvannmatriksen. Under metodevalideringen ga ibuprofen og benzylpenicillin kun ett ion med et areal tydelig forskjellig fra 0, og under optimaliseringen ga koffein kun ett produksjon med et areal tydelig forskjellig fra 0. Sensitiviteten var i disse tilfellene for dårlig. Det videre arbeidet bør derfor inkludere identifisering av flere produksjon, slik at et kvantifiseringsion og et konfirmeringsion kan benyttes under analyse av analyttene. Dette vil styrke kvantifiseringen. Videre bør det gjøres tiltak for å øke sensitiviteten i metoden for disse legemidlene.

I standarden ble det observert en topp som overlappet med toppen til metoprolol. Denne toppen ble imidlertid ikke identifisert for metoprolol i avløpsvannmatriks. Videre viste metronidazol og koffein overlappende topper i avløpsvannmatriks, men ikke ved ren standard. Årsaken til disse toppene ble ikke identifisert. For å kunne analysere de tre legemidlene, må det i det videre arbeidet identifiseres årsaken til disse toppene.

Linearitetsrekken spente over et for vidt område, og med for få prøver innenfor konsentrasjonsområdet 100 ng/mL og 1200 ng/mL. Dette medførte at metodens egnethet for ibuprofen og losartan ikke kunne evalueres. I det videre arbeidet bør linearitetsrekken inneholde flere punkter mellom 100 ng/mL - 1200 ng/mL. Dette for bedre å kunne evaluere både disse og andre legemidlers oppførsel i dette området. For bedre å kunne evaluere analyttens LOD og LOQ, bør det også analyseres prøver spiket i det nedre område.

Etter dSPE-steget var matrikseffekten fortsatt signifikant for flere av legemidlene, og videre arbeid må utføres for å minke denne effekten. Det bør fokuseres på en optimalisering av dSPE-steget, og flere sorbenter må testes. Resultatene viser at PSA ikke fjerner flere av matrikskomponentene som påvirker analysen ved 25 ng/mL. Dette kan indikere en metning av PSA, noe som betyr at større mengder PSA må tilsettes for å få en effekt. Alternativt kan det indikere at matrikskomponentene som påvirker analysen ikke interagerer med sorbenten. Da det under optimalisering med ren standard og i matriks ble observert mulige interaksjoner mellom PSA og flere av legemidlene, bør andre sorbenter enn PSA undersøkes videre. C₁₈ kan eksempelvis være med på å minke mengden fett i avløpsvannet, dette både i kombinasjon med PSA og alene (Anastassiades *et al.* 2007).

Som tidligere nevnt har fluorokinoloner og tetrasykliner evnen til å chelatere med di- og trivalente metallioner. Resultatene fra metodevalideringen indikerer at dette forekom i høyeste grad for ciprofloksacin, der R^{PO} var svært lav. Videre ga tilsetning av Na₂EDTA under QuEChERS ekstraksjonen ingen fordel ved analysen av legemiddelet. Dette indikerer at ciprofloksacin i kompleks med metallionene ble holdt igjen på HLB-kolonnen, og at disse derfor ikke lot seg eluere. Under videre arbeid bør det testes tilsetning av Na₂EDTA før SPE-ekstraksjonen med HLB-kolonnene. Dette for å frigjøre ciprofloksacin og tetrasyklin fra de dannede kompleksene, og få dem over i vandig fase.

De estimerte konsentrasjonene i utløpsvannprøvene ligger i det nedre området til linearitetsrekken, tett opp mot LOQ for sulfametoksazol og trimetoprim, og under LOQ for ketoprofen. Flere av legemidlene viste en høyere LOQ enn disse tre legemidlene, i tillegg til at ibuprofen og losartan viste et dårlig lineært forhold ved konsentrasjoner ≤ 100 ng/mL. Dette indikerer et behov for å oppkonsentrere avløpsvannet. Under videre arbeid må det derfor et større volum vann oppkonsentreres på SPE-kolonnene, noe som vil være uheldig i forhold til tidsbruk. Alternativt må det neddampede residuet rekonstitueres i et mindre volum

Milli-Q vann. Under videre arbeid bør de to metodene testes og sammenlignes med hverandre.

Under arbeidet med metoden ble det kun benyttet morlegemidler. Flere av legemidlene viser imidlertid aktive metabolitter. Videre er to av legemidlene prodrugs, og dermed kun aktiv som metabolitt. For bedre å kunne forstå effekten av legemiddelutslippet i det akvatiske miljø, bør legemidlenes metabolitter og transformasjonsprodukter implementeres.

Referanser

- Aguilera-Luiz, M. M., Vidal, J. L. M., Romero-González, R. & Frenich, A. G. (2012). Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 132 (4): 2171-2180.
- Agwuh, K. N. & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycyclines. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58 (2): 256-265.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86 (2): 412-431.
- Anastassiades, M., Scherbaum, E., Tasdelen, B. & Stajnbaher, D. (2007). Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. I: Ohkawa, H., Miyagawa, H. & Lee, P. W. (red.) *Pesticide chemistry: crop protection, public health, environmental safety*, s. 439 - 458. KGaA, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.
- Anderson, C. R., Rupp, H. S. & Wu, W.-H. (2005). Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075 (1): 23-32.
- Antman, E. M. (2012). *Cardiovascular therapeutics: a companion to Braunwald's Heart disease*. 4 utg. Philadelphia, PA: Elsevier Health Sciences. 832 s.
- Attwood, D. & Florence, A. T. (2012). *FASTtrack Physical Pharmacy*. 2. utg. London, UK: Pharmaceutical Press. 232 s.
- Azzouz, A. & Ballesteros, E. (2013). Influence of seasonal climate differences on the pharmaceutical, hormone and personal care product removal efficiency of a drinking water treatment plant. *Chemosphere*, 93 (9): 2046-2054.
- Banerjee, S. & Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*, 2012.
- Bjørneboe, G.-E. (2009). *Koffein*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/koffein> (lest 22.07.2016).
- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J. J. & Nelieu, S. (2014). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction. *Journal of Chromatography A*, 1349: 11-23.
- Bragança, I., Plácido, A., Paíga, P., Domingues, V. F. & Delerue-Matos, C. (2012). QuEChERS: a new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. *Science of the Total Environment*, 433: 281-289.
- BRITISH STANDARD. (2008). *Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE — QuEChERS-method*. EN 15662:2008. UK.
- Brørs, O. (2009). *Prodrug*. Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/prodrug> (lest 24.10.2015).
- Cerqueira, M. B., Guilherme, J. R., Caldas, S. S., Martins, M. L., Zanella, R. & Primel, E. G. (2014). Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere*, 107: 74-82.

- Cham, E. B., Dykman, J. & Bochner, F. (1982). Urinary excretion of aspirin. *British journal of clinical pharmacology*, 14 (4): 562-564.
- Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T. & Goldbach, H. E. (2003). Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 31 (1): 36-44.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G. S., Tartaglione, L., Grillo, C. & Melchiorre, N. (2006). The Genoa 2005 Outbreak. Determination of Putative Palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis* o vata by a New Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method. *Analytical chemistry*, 78 (17): 6153-6159.
- CVUA Stuttgart. (2011). *Theory*. Tilgjengelig fra: <http://quechers.cvua-stuttgart.de/index.php?nav1o=2&nav2o=2&nav3o=0> (lest 05.09.2015).
- Dai, G., Huang, J., Chen, W., Wang, B., Yu, G. & Deng, S. (2014). Major pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in wastewater treatment plant and receiving water in Beijing, China, and associated ecological risks. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92 (6): 655-661.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C. & Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *International journal of hygiene and environmental health*, 214 (6): 442-448.
- Det Norske Veritas & Eurofins Danmark. (2006). Kartlegging av utvalgte forbindelser i legemidler og kosmetikk. *Tilførsler og tilstand*, SPFO rapport: 949/2006 TA-2156/2006: For statens forurensningstilsyn. . 204 s.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. 3. utg. Chichester: Wiley. 550 s.
- Drugbank. (2013). *Ibuprofen*. Tilgjengelig fra: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01050> (lest 26.10.2015).
- Eadie, M. & Tyrer, J. H. (1980). *Neurological Clinical Pharmacology*: Springer Netherlands. 470 s.
- Ekeberg, D. (2014). *Masseanalytatorer, Massespektrometri, KJM313*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (Forelesning 09.09.2014).
- European Community. (2002). COMMISSION DECISION ((2002/657/EC) of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results (notified under document number C(2002) 3044). *Official Journal of the European Union L 221/8-36*.
- Fatta-Kassinos, D., Vasquez, M. & Kümmerer, K. (2011). Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes—degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency. *Chemosphere*, 85 (5): 693-709.
- Felleskatalogen. (2014a). *Flagyl*. Tilgjengelig fra: <http://www.felleskatalogen.no/medisin/flagyl-sanofi-aventis-559145> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2014b). *Paracetduo*. Tilgjengelig fra: <http://www.felleskatalogen.no/medisin/paracetduo-weifa-579669> (lest 22.07.2013).
- Felleskatalogen. (2015a). *Bactrim*. Tilgjengelig fra: <http://www.felleskatalogen.no/medisin/bactrim-roche-546680> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2015b). *Ciprofloxacin Actavis 250m, 500mg tableter, filmdrasjerte* [Pakningsvedlegg]. Tilgjengelig fra: <http://www.felleskatalogen.no/medisin/pasienter/pil-ciprofloxacin-actavis-547498> (lest 15.10.2015).

- Felleskatalogen. (2015c). *Cozaar*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/cozaar-msd-547687> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2015d). *Tetracyclin*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/tetracyclin-actavis-564576> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2015e). *Zocor*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/zocor-msd-565655> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2016a). *Fenazon - Koffein, Fenazon - Koffein sterke*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/fenazon-koffein-fenazon-koffein-sterke-takeda-559017> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2016b). *Metoprolol Sandos 25mg, 50mg, 100mg, 200mg depottabletter* [Pakningsvedlegg]. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/pasienter/pil-metoprolol-sandoz-depottabletter-sandoz-561426> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2016c). *Norvasc*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/norvasc-pfizer-562142> (lest 22.07.2016).
- Felleskatalogen. (2016d). *Trimetoprim*. Tilgjengelig fra:
<http://www.felleskatalogen.no/medisin/trimetoprim-orion-564836> (lest 15.10.2015).
- Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76 (2): 122-159.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R. H., Phan, C., Tysklind, M. & Larsson, D. (2009). Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (12): 2522-2527.
- Fontanals, N., Marcé, R. & Borrull, F. (2007). New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A*, 1152 (1): 14-31.
- Foye, W. O., Lemke, T. L. & Williams, D. A. (2008). *Foye's principles of medicinal chemistry*. 6. utg. USA: Lippincott Williams & Wilkins. 1377 s.
- Gilar, M., Jaworski, A. & McDonald, T. S. (2014). Solvent selectivity and strength in reversed-phase liquid chromatography separation of peptides. *Journal of Chromatography A*, 1337: 140-146.
- Gjengedal, E. L. F. (2014). *Validering av analysemetoder. Instrumentell uorganisk analyse, KJM340*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (Forelesning 06.10.2014).
- Gleckman, R., Blagg, N. & Joubert, D. W. (1981). Trimethoprim: mechanisms of action, antimicrobial activity, bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions, and therapeutic indications. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 1 (1): 14-19.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A. & Barceló, D. (2010). Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment international*, 36 (1): 15-26.
- Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S. & Barceló, D. (2012). Fast and comprehensive multi-residue analysis of a broad range of human and veterinary pharmaceuticals and some of their metabolites in surface and treated waters by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248: 104-121.
- Grubb, N., Rudy, D., Brater, D. & Hall, S. (1999). Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen and ketoprofen glucuronide in end-stage renal disease: evidence for a 'futile cycle' of elimination. *British journal of clinical pharmacology*, 48: 494-500.
- Grung, M., Heimstad, E., Moe, M., Schlabach, M., Svenson, A., Thomas, K. & Woldegiorgis, A. (2007). *Human and Veterinary Pharmaceuticals, Narcotics, and Personal Care*

- Products in the Environment. *Current State of Knowledge and Monitoring Requirements*, 2325/2007: Statens forurensningstilsyn. 98 s.
- Gunatilake, S. R., Craver, S., Kwon, J.-W., Xia, K., Armbrust, K., Rodriguez, J. M. & Mlsna, T. E. (2013). Analysis of estrogens in wastewater using solid-phase extraction, QuEChERS cleanup, and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 96 (6): 1440-1447.
- Gunatilake, S. R., Kwon, J.-W., Mlsna, T. E. & Xia, K. (2014). A novel approach to determine estrogenic hormones in swine lagoon wastewater using the QuEChERS method combined with solid phase extraction and LC/MS/MS analysis. *Analytical Methods*, 6 (23): 9267-9275.
- Helland, T. G. (2008). *Selected Pharmaceutical Residues in Norwegian Sewage Effluent and the Adjacent Aqueous Environment*. Masteroppgave. Norge: Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet og Universitetssenteret på Svalbard, Fakultet for naturvitenskap og teknologi, Institutt for kjemi. 92 s.
- Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M. & Tai, H. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clinical Biochemist Reviews*, 24 (1): 3-12.
- Hoffmann, E. d. & Stroobant, V. (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*. 3. utg. England: John Wiley & Son, Ltd. 489 s.
- Huber, S., Remberger, M., Kaj, L., Schlabach, M., Jörundsdóttir, H. Ó., Vester, J., Arnórsson, M., Mortensen, I., Swartzon, R. & Dam, M. (2016). A first screening and risk assessment of pharmaceuticals and additives in personal care products in waste water, sludge, recipient water and sediment from Faroe Islands, Iceland and Greenland. *Science of The Total Environment*, 562: 13-25.
- Hval, K. N. (2016). *Informasjon om renseprosessen ved VEAS fra prosessingeniør ved rensesanlegget*: VEAS (e-post til Siri Havstein Aspnes 14.07.2016).
- Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. (2001). *Caffeine for the sustainment of mental task performance: Formulations for military operations*. Washington, USA: National Academies Press. 172 s.
- IUPAC. (1997). *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. I: Wilkinson, A. D. M. A. (red.): Blackwell Scientific Publications, Oxford. Tilgjengelig fra: <http://goldbook.iupac.org> (lest 17.07.2016).
- KEGG. (2016). *KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*. Tilgjengelig fra: <http://www.genome.jp/kegg/> (lest 12.08.2016).
- Kibechu, R. & Sichilongo, K. (2012). A liquid chromatography mass spectrometry method for the determination of some pharmacologically active substances validated using milk as a matrix. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35 (12): 1697-1711.
- Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J. & Snyder, S. A. (2007). Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. *Water research*, 41 (5): 1013-1021.
- Kjemilaboratoriet NMBU. (2014). *H-KL 35*. Ås: Norges miljø- og biovitenskapelige universitet, Institutt for Mattrygghet og Infeksjonsbiologi. 8 s. Upublisert manuskript.
- Kjemilaboratoriet NVH. (2010). *H-KL 22*. Ås: Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet: Institutt for Mattrygghet og Infeksjonsbiologi. 12 s. Upublisert manuskript.
- Koesukwiwat, U., Sanguankaew, K. & Leepipatpiboon, N. (2008). Rapid determination of phenoxy acid residues in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta*, 626 (1): 10-20.

- Kolberg, D. I., Prestes, O. D., Adaime, M. B. & Zanella, R. (2011). Development of a fast multiresidue method for the determination of pesticides in dry samples (wheat grains, flour and bran) using QuEChERS based method and GC-MS. *Food chemistry*, 125 (4): 1436-1442.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A. & Albanis, T. A. (2010). Occurrence and removal of PPCPs in municipal and hospital wastewaters in Greece. *Journal of Hazardous Materials*, 179 (1): 804-817.
- Langford, K. H. & Thomas, K. V. (2009). Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environment International*, 35 (5): 766-770.
- Lazartigues, A., Wiest, L., Baudot, R., Thomas, M., Feidt, C. & Cren-Olive, C. (2011). Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400 (7): 2185-93.
- Lehotay, S. J., De Kok, A. H., Maurice & Van Bodegraven, P. (2005a). Validation of a Fast and Easy Method for the Determination of Residues from 229 Pesticides in Fruits and Vegetables Using Gas and Liquid Chromatography and Mass Spectrometric Detection. *Journal of AOAC international*, 88 (2): 595-614.
- Lehotay, S. J., Maštovská, K. & Lightfield, A. R. (2005b). Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *Journal of AOAC International*, 88 (2): 615-629.
- Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-Gonzalez, R., Vidal, J. L. & Frenich, A. G. (2012). Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 895-896: 39-47.
- Lucci, P., Pacetti, D., Núñez, O. & Frega, N. G. (2012). Current trends in sample treatment techniques for environmental and food analysis. I: Calderon, L. d. A. (red.) *Chromatography: The Most Versatile Method of Chemical Analysis*, s. 127-164. Kroatia: InTech.
- Magkos, F. & Kavouras, S. A. (2005). Caffeine use in sports, pharmacokinetics in man, and cellular mechanisms of action. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45 (7-8): 535-562.
- Mastovska, K., Dorweiler, K. J., Lehotay, S. J., Wegscheid, J. S. & Szpylka, K. A. (2009). Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (10): 5959-5972.
- McKenney, J. M., Ganz, P., Wiggins, B. S. & Saseen, J. S. (2009). Statins. I: Brunzell, J. D. & Ballantyne, C. M. (red.) *Clinical Lipidology: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, s. 253-270. USA: Saunder Elsevier.
- Microsoft office. (2016). *Linest function*. Tilgjengelig fra: <https://support.office.com/en-us/article/LINEST-function-84d7d0d9-6e50-4101-977a-fa7abf772b6d> (lest 13.06.2016).
- Miller, J. N. & Miller, J. C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. 6 utg. England: Pearson Education Limited. 297 s.
- Mohseni-Bandpi, A., Elliott, D. J. & Zazouli, M. A. (2013). Biological nitrate removal processes from drinking water supply-a review. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 11 (1): 1.

- New Zealand Datasheet. (2012). *Ciprofloxacin* [Pakningsvedlegg]. Tilgjengelig fra: <http://www.medsafe.govt.nz/Profs/Datasheet/c/ciprofloxacinTABREX.pdf> (lest 26.10.2015).
- Nguyen, T. D., Lee, B. S., Lee, B. R., Lee, D. M. & Lee, G. H. (2007). A multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass spectrometry with temperature control and vacuum concentration. *Rapid communications in mass spectrometry*, 21 (18): 3115-3122.
- Norsk helseinformatikk. (2009). *Kortikosteroider*. Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/forside/animasjoner/medisiner/kortikosteroider-32157.html> (lest 21.10.2015).
- Norsk helseinformatikk. (2013). *Acetylsalisylsyre*. Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/pasienthandboka/sykdommer/hjerte-kar/acetylsalisylsyre-6982.html?page=all> (lest 20.10.2015).
- Norsk helseinformatikk. (2014). *Antibiotikabehandling*. Tilgjengelig fra: <http://nhi.no/pasienthandboka/sykdommer/infeksjoner/antibiotika-1761.html> (lest 26.10.2015).
- Norsk legemiddelhandbok. (2013a). *L1.2.12.4 Trimetoprim-sulfametoksazol*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/30289> (lest 20.10.2015).
- Norsk legemiddelhandbok. (2013b). *L8.13.1 Statiner*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/66218> (lest 22.07.2016).
- Norsk legemiddelhandbok. (2015a). *L1.2.12.3 Trimetoprim*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/30230> (lest 20.10.2015).
- Norsk legemiddelhandbok. (2015b). *L1.2.14.1 Metronidazol*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/30587/?ids=30686#i30686> (lest 22.07.2016).
- Norsk legemiddelhandbok. (2015c). *L3.7.1.3 Prednisolon/Prednison*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/44199> (lest 22.07.2016).
- Norsk legemiddelhandbok. (2015d). *L8.2.2.5 Metoprolol*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/62030> (lest 27.10.2015).
- Norsk legemiddelhandbok. (2015e). *L8.6.2.7 Losartan*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Generelle/63939> (lest 20.10.2015).
- Norsk legemiddelhandbok. (2016a). *L8.5.1.1 Amlodipin*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/62556/?ids=62557#i62557> (lest 22.07.2016).
- Norsk legemiddelhandbok. (2016b). *L17.1.1.9 Ketoprofen*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/75309/?ids=75310#i75310> (lest 22.07.2016).
- Norsk legemiddelhandbok. (2016c). *L17.1.17 Ibuprofen*. Tilgjengelig fra: <http://legemiddelhandboka.no/Legemidler/s%C3%B8ker/+%2Bibuprofen/75146> (lest 22.07.2016).
- Núñez, M., Borrull, F., Fontanals, N. & Pocurull, E. (2015). Determination of pharmaceuticals in bivalves using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407 (13): 3841-3849.
- Oehme, M. (2007). *Quality control in organic trace analysis*. For kurset AT-324: Techniques for the trace analysis of organic pollutants in Arctic environments, Universitetsenteret på Svalbard. 74 s. Upublisert manuskript.

- Peysson, W. & Vulliet, E. (2013). Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1290: 46-61.
- Poole, C. F. (2003). *The essence of chromatography*. Amsterdam: Elsevier. 925 s.
- Pubchem. (2016). Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (lest 27.10.2015).
- Reseptregisteret. (2016). Tilgjengelig fra: <http://www.reseptregisteret.no/> (lest 09.07.2016).
- Roberts, J., Kumar, A., Du, J., Hepplewhite, C., Ellis, D. J., Christy, A. G. & Beavis, S. G. (2016). Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow. *Science of the Total Environment*, 541: 1625-1637.
- Ryrfors, P. (2016). *Kort prosessbeskrivelse av VEAS renseprosess fra prosessingeniør ved rensesanlegget*. VEAS (E-post til Siri Havstein Aspnes 09.08.2016).
- Sagberg, P., Berg, K. G., Johnsen, K. G., Ryrfors, P. & Wien, A. (1995). Experiences with upstream biofiltration process for nitrogen removal at VEAS - status for the development of the VEAS concept. I: Valve, M. (red.) *Nitrogen removal from municipal wastewater*, s. 72-80. Finland: Nordic Council of Ministers.
- Salgado, R., Marques, R., Noronha, J., Carvalho, G., Oehmen, A. & Reis, M. (2012). Assessing the removal of pharmaceuticals and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environmental Science and Pollution Research*, 19 (5): 1818-1827.
- Santos, L. H., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D. & Montenegro, M. C. B. (2013). Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461: 302-316.
- Schneider, S., Schmitt, M. O., Brehm, G., Reiher, M., Matousek, P. & Towrie, M. (2003). Fluorescence kinetics of aqueous solutions of tetracycline and its complexes with Mg²⁺ and Ca²⁺. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2 (11): 1107-1117.
- Shackman, J. G. (2013). General instrumentation. I: Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. & Lloyd, D. K. (red.) *Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation*, s. 283-304. USA: Elsevier Inc.
- Sigma Aldrich. (2016). *Supelclean™ PSA SPE Bulk Packing*. Tilgjengelig fra: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/52738u?lang=en®ion=NO> (lest 14.08.2016).
- Simpson, N. J. K. & Wells, M. J. M. (2000). Introduction to solid-phase extraction. I: Simpson, N. J. K. (red.) *Solid-phase extraction: principles, techniques, and applications*, s. 1-16. Sveits: Marcel Dekker, Inc.
- Sisson, G., Goodwin, A., Raudonikiene, A., Hughes, N. J., Mukhopadhyay, A. K., Berg, D. E. & Hoffman, P. S. (2002). Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (7): 2116-2123.
- Stevens, J. J., Dave. (2010). *QuEChERS 101: The Basics and Beyond*: Agilent Technologies, Inc. Tilgjengelig fra: https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS_101_10_11_01.pdf (lest 05.09.2015).
- Stone, P., Glauner, T., Kuhlmann, K., Schlabach, T. & Miller, K. (2009). New Dynamic MRM Mode Improves Data Quality and Triple Quad Quantitation in Complex Analyses. *Agilent Technologies, Technical Overview*: 8s.

- Sun, Q., Li, M., Ma, C., Chen, X., Xie, X. & Yu, C.-P. (2016). Seasonal and spatial variations of PPCP occurrence, removal and mass loading in three wastewater treatment plants located in different urbanization areas in Xiamen, China. *Environmental Pollution*, 208: 371-381.
- Tauxe-Wuersch, A., De Alencastro, L. F., Grandjean, D. & Tarradellas, J. (2005). Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 39 (9): 1761-1772.
- Thomas, K., Langford, K., Grung, M., Schlabach, M. & Dye, C. (2007). Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluents from hospitals (Ullevål and Rikshospitalet) and VEAS wastewater treatment works. , 8257751111, TA-2246/2007: Statens forurensningstilsyn. 40 s.
- Tolls, J. (2001). Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental science & technology*, 35 (17): 3397-3406.
- Uivarosi, V. (2013). Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules*, 18 (9): 11153-11197.
- Upton, R., Buskin, J., Williams, R., Holford, N. & Riegelman, S. (1980). Negligible excretion of unchanged ketoprofen, naproxen, and probenecid in urine. *Journal of pharmaceutical sciences*, 69 (11): 1254-1257.
- Uslu, M. Ö., Yediler, A., Balcioğlu, I. A. & Schulte-Hostede, S. (2008). Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in solid matrices. *Water, air, and soil pollution*, 190 (1-4): 55-63.
- VEAS. (2016a). *Om renseprosessen*. Tilgjengelig fra: <http://www.veas.nu/home/produkt/vann> (lest 20.07.2016).
- VEAS. (2016b). *Om VEAS*. Tilgjengelig fra: <http://www.veas.nu/home/om-veas> (lest 20.07.2016).
- VEAS. (2016c). *VEAS' historie – 3 kommuner samarbeider om en renere Oslofjord*. Tilgjengelig fra: <http://www.veas.nu/home/om-veas/veas--historie> (lest 20.07.2016).
- VEAS. (2016d). *VEAS konseptet*. 2 s. Upublisert manuskript.
- Vieno, N., Tuhkanen, T. & Kronberg, L. (2007). Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland. *Water research*, 41 (5): 1001-1012.
- Vieno, N. M., Tuhkanen, T. & Kronberg, L. (2005). Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental science & technology*, 39 (21): 8220-8226.
- Vojtova, V. & Urbanek, K. (2009). [Pharmacokinetics of tetracyclines and glycolcylines]. *Klinicka mikrobiologie a infekcni lekarstvi*, 15 (1): 17-21.
- Vråle, L. (1983). Nitrogenfjerning ved nitrifikasjon/denitrifikasjon i aktivslamanlegg. Resultater fra fullskala forsøk ved HIAS renseanlegg, 0-80025: Norsk institutt for vannforskning. 85 s.
- Washington, N. (1991). *Antacids and Anti Reflux Agents*. USA: CRC Press. 320 s.
- Waters Corporation. (1998). *Solid-Phase Extraction with Oasis HLB Sorbent: Simple Procedures for Superior Sample Preparation*. Tilgjengelig fra: http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/my_oas98.pdf (lest 22.07.2016).
- Waters Corporation. (2014). *Oasis HLB Cartridges and 96-Well Plates–Care and Use Manual*: Waters Corporation: Milford, MA. Tilgjengelig fra: <https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf> (lest 03.01.2016).
- Weston, A. & Brown, P. R. (1997). *High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices*. USA: Academic Press. 280 s.

- Xu, J., Winkler, J. & Derendorf, H. (2007). A pharmacokinetic/pharmacodynamic approach to predict total prednisolone concentrations in human plasma. *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 34 (3): 355-372.
- Zhang, L., Li, X.-Z. & Poole, K. (2001). Fluoroquinolone susceptibilities of efflux-mediated multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (4): 549-552.
- Zhang, Z. & Zhou, J. (2007). Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1154 (1): 205-213.
- Zhao, L. & Stevens, J. (2010). Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Liver Using Agilent SampliQ QuEChERS Kits by LC-MS-MS, 5990-5085 EN. USA: Agilent technologies Inc.

Vedlegg A

Innhold

Figuroversikt	II
Tabbeloversikt	II
Kjemiske struktur	X
Utstyr, kjemikalier og standarder og kromatografiske parametere	XIII
Resultater	XVIII
Standardstabilitet	XVIII
Massespektrometerparametere	XIX
Opprensning og ekstraksjon	XXV
Metodevalidering	XLV
Innløpsvannprøver	CXXVII
Standard operation procedure	CXXIX

Figuroversikt

Figur A 1 Primær og sekundær amin, PSA, sin struktur (Sigma Aldrich 2016).....	IX
Figur A 2 Kvantifiseringstoppen til ciprofloksacin i ren standard ved konsentrasjon 1200 ng/mL Toppen ved ca. 1,5 minutter er av ukjent opprinnelse.....	LXI
Figur A 3 Kalibreringskurven for ibuprofen som ren standard løst i Milli-Q vann.....	LXVII
Figur A 4 Kalibreringskurven for losartan sitt kvantifiseringsion som ren standard løst i Milli-Q vann.	LXXXI
Figur A 5 Trimetoprim sin kvantifiseringstopp i ren standard ved konsentrasjon 300 ng/mL. Toppen ved 1,5 minutter er av ukjent opprinnelse.....	CXIII

Tabelloversikt

Tabell A 1 De 16 utvalgte legemidlene.....	VII
Tabell A 2 Kjemikalier, reagenser og gasser	X
Tabell A 3 Standarder	XI
Tabell A 4 Utstyr.....	XIII
Tabell A 5 Faste HPLC-parametere	XIV
Tabell A 6 Rådata holdbarhetstester for 9 av de 15 utvalgte legemidlene.....	XV
Tabell A 7 Holdbarheten til stamløsningene på 1 mg/mL og standardløsningene på 10µg/mL	XV
Tabell A 8 De optimaliserte massespektrometerparameterne for de 15 utvalgte legemidlene samt sulfadoxin, ved positiv polaritet	XVI
Tabell A 9 Massespektrometerparametere for internstandarder og gjenfinningsstandard...XVII	
Tabell A 10 Gjennomsnittlig areal for de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved de 6 ulike metodene fra Tabell 3-3.	XVII
Tabell A 11 Gjennomsnittsareal for de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved kolonnetemperatur fra 20 - 50°C.....	XVIII
Tabell A 12 Areal målt ved massespektrometeroptimaliseringen.	XIX
Tabell A 13 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ubuffret metode, EN-metoden og AOAC-metoden. MgSO ₄ er benyttet som tørkesalt.	XXII
Tabell A 14 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ubufret metode, EN-metoden og AOAC-metoden. Na ₂ SO ₄ er benyttet som tørkesalt.....	XXIII
Tabell A 15 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved EN-metoden hvor 0,1g/mL Na ₂ EDTA er tilsatt. Både MgSO ₄ og Na ₂ SO ₄ er benyttet som tørkesalt.	XXIV
Tabell A 16 Gjennomsnittlig areal ved EN-metoden og EN-metoden med tilsatt 0,1g/mL Na ₂ EDTA. Na ₂ SO ₄ og MgSO ₄ er begge benyttet som tørkesalt. Med Na ₂ SO ₄ er også ubufret metode testet.....	XXV
Tabell A 17 Areal ved EN-metoden og EN-metoden med tilsatt 0,1g/mL Na ₂ EDTA. Na ₂ SO ₄ og MgSO ₄ er begge benyttet som tørkesalt. Med Na ₂ SO ₄ er også ubufret metode testet..	XXVI
Tabell A 18 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ACN og MeOH som ekstraksjonsmiddel.	XXVII
Tabell A 19 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ACN med og uten ulike tilsetninger som ekstraksjonsmiddel.....	XXVIII
Tabell A 20 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende ekstraksjonstid.	XXIX
Tabell A 21 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende sentrifugeringstid.....	XXX

Tabell A 22 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 valgte legemidlene samt sulfadoxin, ved ulik sentrifugeringshastighet.	XXXI
Tabell A 23 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE-steget.	XXXII
Tabell A 24 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved 37,5 mg PSA til dSPE-steget, samt ved n-heksanopprensning istedenfor dSPE.	XXXIII
Tabell A 25 Gjennomsnittlig areal til 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE-steget.	XXXIV
Tabell A 26 Areal for benzylpenicillin ved 50 mg og 75 mg PSA benyttet til dSPE-steget.	XXXV
Tabell A 27 Gjennomsnittlig areal til 14 av de 15 legemidlene, samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE.	XXXVI
Tabell A 28 Prosentvis gjenfinning for 14 av de 15 legemidlene ved nedddamping av standardløsninger i vann.	XXXVII
Tabell A 29 Rådata for metodetest hvor ubufret metode, EN-metoden og EN-metoden tilsatt 0,1g/mL Na ₂ EDTA, er testet mot hverandre med utløpsvann fra VEAS. Na ₂ SO ₄ er brukt som tørkesalt.	XXXVIII
Tabell A 30 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for acetylsalisylsyre sine S-prøver.	XLIII
Tabell A 31 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for acetylsalisylsyre sine M-prøver.	XLIV
Tabell A 32 Areal for acetylsalisylsyre sine S-prøver ved 100 ng/mL.	XLV
Tabell A 33 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for amlodipin sine S-prøver.	XLVI
Tabell A 34 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for amlodipin sine M-prøver.	XLVII
Tabell A 35 Verdier for linearitetsrekken til amlodipin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.	XLVIII
Tabell A 36 Areal for amlodipin sine S-prøver ved 100 ng/mL.	XLVIII
Tabell A 37 Rådata og beregninger for R ^T , og R ^{PO} og R ^{MS} for S-prøvene til amlodipin ved 600 ng/mL.	XLIX
Tabell A 38 Rådata og beregninger for R ^T , og R ^{PO} og R ^{MS} for M-prøvene til amlodipin ved 600 ng/mL.	L
Tabell A 39 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for benzylpenicillin sine S-prøver.	LI
Tabell A 40 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for benzylpenicillin sine M-prøver.	LII
Tabell A 41 Verdier for linearitetsrekken til benzylpenicillin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.	LIII
Tabell A 42 Areal for benzylpenicillin sine S-prøver ved 100 ng/mL.	LIII
Tabell A 43 Rådata og beregninger for R ^T , og R ^{PO} og R ^{MS} for S-prøvene til benzylpenicillin ved 600g/mL.	LIV
Tabell A 44 Rådata og beregninger for R ^T , og R ^{PO} og R ^{MS} for M-prøvene til benzylpenicillin ved 600 ng/mL.	LV
Tabell A 45 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ciprofloksacin sine S-prøver.	LVI
Tabell A 46 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ciprofloksacin sine M-prøver.	LVII

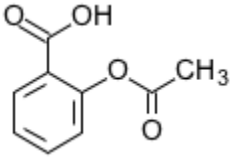
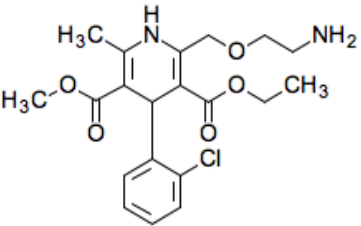
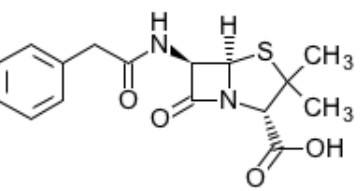
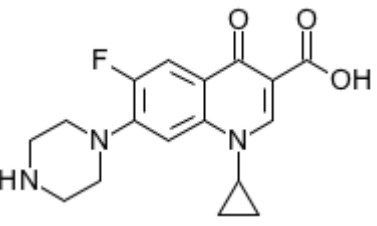
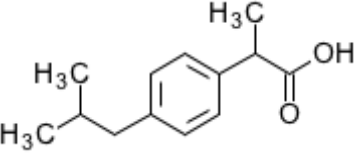
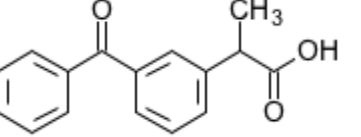
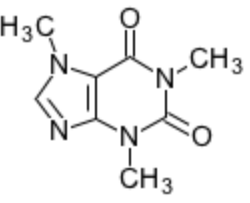
Tabell A 47 Verdier for linearitetsrekken til ciprofloksacin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.....	LVIII
Tabell A 48 Areal for ciprofloksacin sine S-prøver ved 100 ng/mL	LVIII
Tabell A 49 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ciprofloksacin ved 600 ng/mL.	LIX
Tabell A 50 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ciprofloksacin ved 600 ng/mL.	LX
Tabell A 51 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ibuprofen sine S-prøver.....	LXII
Tabell A 52 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ibuprofen sine M-prøver.....	LXIII
Tabell A 53 Verdier for linearitetsrekken til ibuprofen beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.....	LXIV
Tabell A 54 Areal for ibuprofen sine S-prøver ved 100 ng/mL.....	LXIV
Tabell A 55 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ibuprofen ved 600 ng/mL.	LXV
Tabell A 56 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ibuprofen ved 600 ng/mL.	LXVI
Tabell A 57 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ketoprofen sine S-prøver.....	LXVIII
Tabell A 58 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ketoprofen sine M-prøver.....	LXIX
Tabell A 59 Verdier for linearitetsrekken til ketoprofen beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.....	LXX
Tabell A 60 Areal for ketoprofen sine S-prøver ved 100 ng/mL.....	LXX
Tabell A 61 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ketoprofen ved 600 ng/mL.	LXXI
Tabell A 62 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ketoprofen ved 600 ng/mL.	LXXII
Tabell A 63 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for koffein sine S-prøver.	LXXIII
Tabell A 64 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for koffein sine M-prøver.	LXXIV
Tabell A 65 Areal for koffein sine S-prøver ved 200 ng/mL.....	LXXV
Tabell A 66 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for losartan sine S-prøver.	LXXVI
Tabell A 67 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for losartan sine M-prøver..	LXXVII
Tabell A 68 Verdier for linearitetsrekken til losartan beregnet ved Excel sin LINEST-funksjon.....	LXXVIII
Tabell A 69 Areal for losartan sine S-prøver ved 100 ng/mL.....	LXXVIII
Tabell A 70 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} S-prøvene til losartan ved 600 ng/mL.	LXXIX
Tabell A 71 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til losartan ved 600 ng/mL.	LXXX
Tabell A 72 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metoprolol sine S-prøver.....	LXXXII
Tabell A 73 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metoprolol sine M-prøver.....	LXXXIII

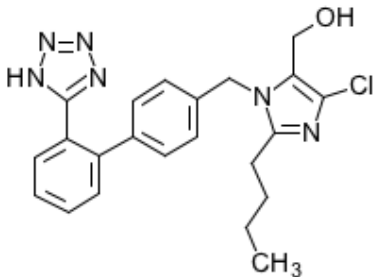
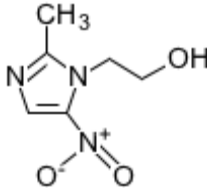
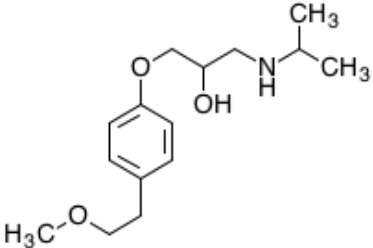
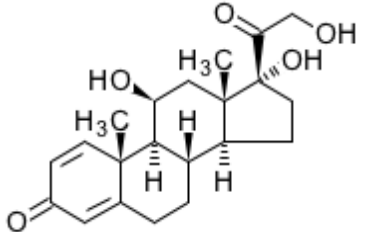
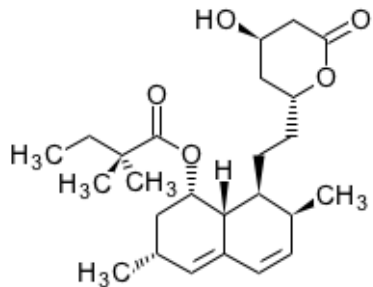
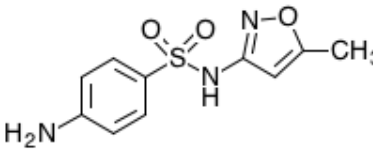
Tabell A 74 Areal for metoprolol sine S-prøver ved 100 ng/mL.....	LXXXIV
Tabell A 75 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metronidazol sine S-prøver..	LXXXV
Tabell A 76 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metronidazol sine M-prøver..	LXXXVI
Tabell A 77 Areal for metronidazol sine S-prøver ved 100 ng/mL	LXXXVII
Tabell A 78 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for prednisolon sine S-prøver.	LXXXVIII
Tabell A 79 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for prednisolon sine M-prøver.....	LXXXIX
Tabell A 80 Verdier for linearitetsrekken til prednisolon, beregnet ved Excel sin LINEST-funksjon.	XC
Tabell A 81 Areal for prednisolon sine S-prøver ved 100 ng/mL	XC
Tabell A 82 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til prednisolon ved 600 ng/mL.	XCI
Tabell A 83 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til prednisolon ved 600 ng/mL.	XCII
Tabell A 84 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for simvastatin sine S-prøver.	XCIII
Tabell A 85 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for simvastatin sine M-prøver.....	XCIV
Tabell A 86 Verdier for linearitetsrekken til simvastatin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.	XCIV
Tabell A 87 Areal for simvastatin sine S-prøver ved 100 ng/mL	XCIV
Tabell A 88 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til simvastatin ved 600 ng/mL.	XCVI
Tabell A 89 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til simvastatin ved 600 ng/mL.	XCVII
Tabell A 90 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfadoxin sine S-prøver.....	XCVIII
Tabell A 91 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfadoxin sine M-prøver.....	XCIX
Tabell A 92 Verdier for linearitetsrekken til sulfadoxin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.	C
Tabell A 93 Areal for sulfadoxin sine S-prøver ved 100 ng/mL	C
Tabell A 94 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til sulfadoxin ved 600 ng/mL.	CI
Tabell A 95 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til sulfadoxin ved 600 ng/mL.	CII
Tabell A 96 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfametoksazol sine S-prøver..	CIII
Tabell A 97 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfametoksazol sine M-prøver..	CIV
Tabell A 98 Verdier for linearitetsrekken til sulfametoksazol beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.....	CV
Tabell A 99 Areal for sulfametoksazol sine S-prøver ved 100 ng/mL	CV
Tabell A 100 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til sulfametoksazol ved 600 ng/mL.	CVI

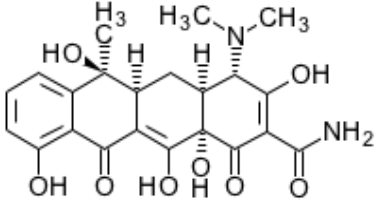
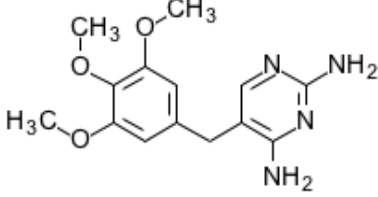
Tabell A 101 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til sulfametoksazol ved 600 ng/mL.	CVII
Tabell A 102 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for trimetoprim sine S-prøver.	CVIII
Tabell A 103 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for trimetoprim sine M-prøver..	CIX
Tabell A 104 Verdier for linearitetsrekken til trimetoprim beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.	CX
Tabell A 105 Areal for trimetoprim sine S-prøver ved 100 ng/mL	CX
Tabell A 106 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til trimetoprim ved 600 ng/mL.	CXI
Tabell A 107 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til trimetoprim ved 600 ng/mL.	CXII
Tabell A 108 Deteksjonsgrensen, LOD, og kvantifiseringsgrensen, LOQ for 14 av de 15 ulike legemidlene, samt sulfadoxin.	CXV
Tabell A 109 Gjennomsnittlige verdier for responsfaktortesten til legemidlenes ulike ioner.	CXVI
Tabell A 110 Den relative ioneintensiteten til 8 av de 15 utvalgte legemidlene, samt sulfadoxin.	CXVII
Tabell A 111 Gjennomsnitt av areal for 600 ng/mL og 100 ng/mL kontrollprøvene	CXVIII
Tabell A 112 Estimert konsentrasjon for kontrollprøver ved 600 ng/mL og 100 ng/mL	CXX
Tabell A 113 Total gjenfinning, R^T , matrikseffekt, R^{MS} og gjenfinning i prøveopparbeidelsen, R^{PO} , for 14 av de 15 ulike legemidlene, samt sulfadoxin.	CXXII
Tabell A 114 Areal og S/N forhold for legemidlene detektert i innløpsvannprøvene, dag 1.	CXXV
Tabell A 115 Areal og S/N forhold for legemidlene detektert i innløpsvannprøvene, dag 2.	CXXVI

Kjemisk struktur

Tabell A 1 De 16 utvalgte legemidlene

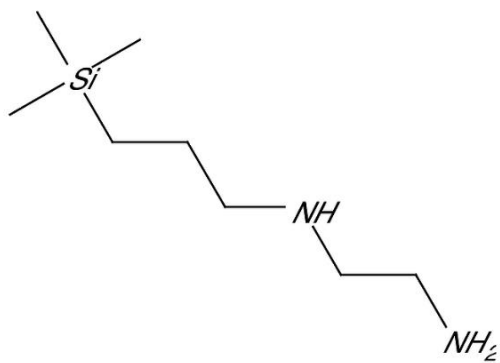
	Molekylformel ^a	Molekylvekt i g/mol ^a	Medikamentklasse	Struktur ^b
Acetylsalisylsyre	C ₉ H ₈ O ₄	180,2	NSAID	
Amlodipin	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	408,9	Kalsiumkanal-antagonist	
Benzylpenicillin	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	334,4	Antibiotikum	
Ciprofloksacin	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331,3	Antibiotikum	
Ibuprofen	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,3	NSAID	
Ketoprofen	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,2	NSAID	
Koffein	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,2	Stimulanter	

	Molekylformel ^a	Molekylvekt i g/mol ^a	Medikamentklasse	Struktur ^b
Losartan	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O	422,9	Angiotensin II-reseptorantagonist	
Metronidazol	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	171,2	Antibiotikum	
Metoprolol	C ₁₅ H ₂₅ NO ₃	267,4	β-1-sektiv andrenergisk antagonist	
Prednisolon	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360,4	Kortikosteroid	
Simvastatin	C ₂₅ H ₃₈ O ₅	418,6	Statiner	
Sulfametoksazol	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,3	Antibiotikum	

	Molekylformel ^a	Molekylvekt i g/mol ^a	Medikamentklasse	Struktur ^b
Tetrasyklin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	44,4	Antibiotikum	
Trimetoprim	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,3	Antibiotikum	

^a (Pubchem 2016)

^b (KEGG 2016)



Figur A 1 Primær og sekundær amin, PSA, sin struktur (Sigma Aldrich 2016)

Utstyr, kjemikalier, standarder og kromatografiske parametere

Tabell A 2 Kjemikalier, reagenser og gasser

	Kvalitet	Renhet %	Leverandør	Produsent	CAS-nr.
Acetonitril	HiPerSolv CHROMANORM® Isokratisk for HPLC .	99,9	VWR International AS, Oslo, Norge,	VWR International, Fontenay-sous- Bois, Frankrike	75-05-8
Dimetylsulfoxid		>99,5	VWR International AS, Oslo, Norge	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	67-68-5
Eddiksyre	Puriss p.a., ACS reagent, reagISO, reag Ph, Reag Eur	≥99,8	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	64-19-7
Heksan	For sporanalyse	≥99,0,	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Fluka Chemie GmbH, Sigma Aldrich, Buchs Sveits	110-54-3
Maursyre	ACS reagent.	≥96	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Sigma Aldrich, Seelze Tyskland	64-18-6
Metanol	HiPerSolv CHROMANORM® Reag. Ph, Eur., gradient for HPLC	≥99,8	VWR International AS, Oslo, Norge	VWR International, Fontenay-sous- Bois, Frankrike	67-56-1
Etylendiamintetra- eddiksyre dinatriumsalt dihydrat	For elektroforese, for molekylærbiologi	99,0-101.0 (titrering)	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Sigma Aldrich, St. Louis, USA	6381-92-6
Magnesiumsulfat	Vannfri, Reagent Plus	≥99,5	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Honeywell International Inc. Kina	7487-88-9
Milli-Q vann	>18mΩ, Type 1		Merck Life Science AS, Oslo, Norway	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	
Natriumsulfat	ACS reagent, vannfri, granulær	≥99,0,	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Bangalore India	7757-82-6
Dinatriumcitrat dibasic sesquihydrat	Puriss p.a.	≥99,	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	6132-05-4
Trinatriumcitrat dihydrat		≥99	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Sigma Aldrich, Wien, Østerrike	6132-04-3

Natrium acetat trihydrat	Puriss p.a., ACS reagent, Reag ISO, Reag Ph Eur.	≥99,5	Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	6131-90-4
Natriumklorid	AnalaR, NORMPAPUR, ACS, Reag. Ph Eur	99,5 - 100,5	VWR International AS, Oslo, Norge	VWR International, Leuven, Belgia	7647-14-5
Natriumhydroksid	EMSURE® analytisk reagens		VWR International AS, Oslo, Norge	Merck, KGaA, Darmstadt, Tyskland	1310-73-2
PSA Bounded Silica			Sigma Aldrich, Oslo, Norge	Supelco analytical, Bellefonte, Pennsylvania, USA	
Nitrogen	5.0	99,999	AGA, Oslo, Norge		7727-37-9
Nitrogen	Fra generator. Maks 0,01 % O ₂ -innhold		Generator		Ionekildegass

Tabell A 3 Standarder

Standard	Løsning	Renhet %	Batch/lot nr.	CAS nr	Produsent	Leverandør
Acetylsalisylsyre	Pulver	98,1 ± 0,5	13537	80-78-2	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Amlodipin	Pulver	99,5 ± 0,5	16024	88150-42-9	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Ciprofloksacin	Pulver	≥ 98,0	BCBC7322V	85721-33-1	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Shanghai, Kina	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Ibuprofen Na-salt	Pulver	> 98,0		31121-93-4	Sigma Aldrich. Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
(±)- Ibuprofen-D ₃	Ampulle	99,5 ± 0,5	12308 Neat batch 06396	121662-14-4	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Ketoprofen	Pulver	99,9	SZBA166XV	22071-15-4	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Koffein	Pulver	Reagent plus		58-08-2	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Koffein- ¹³ C ₃	Pulver	99,0		78072-66-9	Sigma Aldrich. Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland

Losartan kalium	Pulver	99,5 ± 0,5	15994	124750-99-8	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Metoprolol (fri base)	Pulver	99,5 ± 0,5	13279	51384-51-1	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Metoprolol-D ₇ Hydrogenklorid	Ampulle	99,0 ± 0,5	15976 Neat batch 10282	1219798-61-4	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Metronidazol	Pulver	99,8	SZB9145XV	443-48-1	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Penicillin G Na-salt (Benzylpenicillin)	Pulver	Bioreagent	10K1043	69-57-8	Sigma Aldrich, Shanghai, Kina	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Prednisolon	Pulver	99,0	SZBA106XV	50-24-8	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Simvastatin	Pulver	99,5 ± 0,5	15995	79902-63-9	Chiron AS, Trondheim, Norge	Chiron AS, Trondheim, Norge
Sulfametoksazol	Pulver	> 99,0	37H1112	723-46-6	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Sulfadoxin	Pulver	99,9	SZBE045XV	2447-57-6	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Sulfadoxin-D ₃	Pulver	> 99,0	070521	1262770-70-6	Witega, Berlin, Tyskland	Witega, Berlin, Tyskland
Tetrasyklin hydroklorid	Pulver	98,0	SZBD148XV	64-75-5	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Trimetoprim	Pulver	99,7	SZBD010XV	738-70-5	Fluka analytical, Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge

Tabell A 4 Utstyr

Produkt	Spesifikasjon	Produsent	Leverandør
HPLC-prøveglass	Polypropylen, 0,7 m med snap ring.	VWR International, Radnord, PA, USA	VWR International AS, Oslo, Norge
Kork til prøveglass	Snap ring 11 mm, blue, soft. Red rubber/PTPE beige 45°, 1,0 mm	VWR International, Radnord, PA, USA	VWR International AS, Oslo, Norge
Sentrifugerør med kork	50 mL, Polypropylen		
Eppendorfrør	1,5 mL. Grønn. Polypropylen. Flip rør	Sigma Aldrich, Seelze, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Costar, Spin X	Sentrifugerør filter 0,22µm Nylon. Polypropylenrør, ikke-steril	Corning Inc., Corning NY, USA	VWR International AS, Oslo, Norge
Finpipetter	2 - 20 µL, 20 - 200 µL, 100 - 1000 µL, 500 - 5 000 µL,	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	
Vakuumbiford	Vacmaster™20, 24 posisjoner.	Biotage, Uppsala, Sverige	
SPE kolonne	Oasis HLB 12cc Vac Cartridge, 500 mg sorbent per patron, 60 µm partikkelstørrelse, porestørrelse 80Å	Waters, Milford, MA, USA	Waters Norge, Oslo, Norge
Large volume samplers med adaptere	15stk	Supelco analytical, Bellefonte, Pennsylvania, USA	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Whatman Glassmikrofiberfilterpapir	binder free, Grade GF/C, 47 mm, porestørrelse: 1,2µm	GE Healthcare, Buckinghamshire, England	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
HPLC-Kolonne	Zorbax Eclipse Plus C18. Rapid Resolution HD. 2,1 x 100 mm. 1,8µm porestørrelse	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
Forkolonne	Agilent UHPLC fast guard Eclipse Plus C18, 2,1 x 5 mm, 1,8 µm porestørrelse.	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
Målekolbe	5, 10, 25, 500, 1000 mL m/kork		
Vakuumbfilterflaske	1000 mL		
Sentrifugerør med kork	12 mL, konisk		
Buchner funnel			
Analysevekt	AT 200 Excellence XA105 Dual Range	Mettler Toledo. Greifensee, Sveits	
Analysevekt	OHAUS Adventurer	OHAUS	Sigma Aldrich,

		Corporation, Shanghai, Kina	Oslo, Norge
Neddemper	Reacti-Vap III™ Evaporator	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	VWR International AS, Oslo, Norge
HPLC	1200 series, inkludert autosampler, binærpumpe, kolonneovn.	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
MS - trippelkvadrupol	6460, QqQ	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
MassHunter, Quantitative analysis for QqQ	Versjon B.07.00/Build 7.0.457.0	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
MassHunter Qualitative analysis for QqQ	Versjon B.06.00/Build 6.0.633.10	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA	Matriks AS, Oslo, Norge
Sentrifuge	Rotanta, 50 mL, 16 posisjoner.	Andreas Hettih GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Tyskland	Dipl.ing. Houm AS, Oslo, Norge
Bordsentrifuge	Micro 1207 - 230 V. 2 mL, 12 posisjoner.	VWR International, Radnor, PA, USA	VWR International AS, Oslo, Norge
Vortex	MS 3 basic	IKA-Werke GmbH & Co, KG. Wilmington, N.C, USA	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Ristemaskin	VXR basic Vibrax	IKA® Werke GmbH & Co, KG. Staufen, Tyskland	Sigma Aldrich, Oslo, Norge
Pasteur-pipette	Med smokk		

Tabell A 5 Faste HPLC-parametere

Parameter	
Injeksjonsvolum	5 µL
Oppsugshastighet	200µL/min
Injeksjonshastighet	200 µL/min
Oppsugsposisjon	0,0 mm
Likevektstid	2 sec
Prøve-utspylingfaktor	5 ganger injeksjonsvolum
Gjennomstrømningshastighet	0,225 mL/min
Kolonne	Agilent Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ (2,1 x 100 mm, 1,8 µm)
Forkolonne	Agilent UHPLC fast guard Eclipse Plus C ₁₈ , (2,1 x 5 mm, 1,8 µm)
Mobilfase A	0,1 % V/V maursyre i vann
Mobilfase B	0,1 % V/V maursyre I ACN
Vaskeløsning av nål	1:1 MeOH: Vann

Resultater

Standardstabilitet

Tabell A 6 Rådata holdbarhetstester for 9 av de 15 utvalgte legemidlene.

	Acetylsalisylsyre	Amlodipin	Ibuprofen	Koffein	Losartan
Areal stamløsning, 1 måned	1 871	147 467	82 273	278 126	260 579
Areal stamløsning 1 måned	1 750	144 936	83 400	257 001	251 900
Areal stamløsning, Ny	1 683	143 564	63 954	252 029	240 026
Areal stamløsning, Ny	1 726	155 068	62 502	266 112	271 043
Areal standardløsning, 1 måned	462 702	475 613	29 953	94 831	998 594
Areal standardløsning, 1 måned	438 358	508 891	24 806	95 675	1 021 313
Areal standardløsning, Ny	456 144	749 657	23 982	107 759	1 061 462
Areal standardløsning, Ny	457 793	733 565	28 107	108 755	984 938

	Metoprolol	Prednisolon	Simvastatin	Trimetoprim
Areal stamløsning, 1 måned	104 547	136 366	194 730	138 811
Areal stamløsning 1 måned	104 569	134 150	199 085	139 754
Areal stamløsning, Ny	109 526	169 431	197 601	155 596
Areal stamløsning, Ny	99 472	170 583	211 416	151 637
Areal standardløsning, 1 måned	350 152		638 626	
Areal standardløsning, 1 måned	359 478		652 259	
Areal standardløsning, Ny	352 242	348 640	650 392	296 963
Areal standardløsning, Ny	361 502	352 081	664 291	305 674

Tabell A 7 Holdbarheten til stamløsningene på 1 mg/mL og standardløsningene på 10µg/mL

Legemiddel	Stamløsning 1 mg/mL	Standardløsning 10µg/mL
Acetylsalisylsyre	≤1 måned	≤1 måned
Amlodipin	≤1 måned	> måned
Benzylpenicillin	Opptil 1 uke	
Ciprofloksacin	12 måneder	
Ibuprofen	≤1 måned*	≤1 måned
Ketoprofen	8 måneder	
Koffein	≤1 måned	> måned
Losartan	≤1 måned	≤1 måned
Metoprolol	≤1 måned	≤1 måned
Metronidazol	9 måneder	
Prednisolon	> måned	> måned
Simvastatin	≤1 måned	≤1 måned
Sulfadoxin	3 måneder	
Sulfametoksazol	3 måneder	
Tetrasyklin	Opptil 1 uke	
Trimetoprim	> måned	> måned

* 1 måned gammel stamløsning ga høyere areal enn nylaget stamløsning. Det er ikke mulig å si nøyaktig årsak, men det har trolig forekommet løsemiddelfordamping under lagring.

Massespektrometerparametere og kromtografisk separasjon

Tabell A 8 De optimaliserte massespektrometerparametere for de 15 utvalgte legemidlene samt sulfadoxin, ved positiv polaritet

	Forløper- ion	Produkt- ion	Kollisjons- energi	Fragmentor	Celleakselerasjon- spenning
Acetylsalisylsyre	179	79.1	20	125	7
		<u>135</u>	7	125	7
Amlodipin	409.2	<u>238.1</u>	10	65	7
		294.1	3	80	7
		377.1	13	100	7
Ciprofloksacin	332	231.1	35	100	7
		288.2	14	120	7
		<u>314.2</u>	14	110	7
Ibuprofen	207	105.1	15	60	7
		119	17	60	7
		<u>161</u>	9	60	7
Ketoprofen	255	105	20	130	7
		<u>209</u>	8	115	7
Koffein	195.3	<u>138.2</u>	10	100	7
Losartan	423.2	<u>207.2</u>	20	90	7
		377.1	12	110	7
		<u>56.1</u>	25	115	7
Metoprolol	268.2	72.1	18	115	7
		116.1	16	120	7
		82	25	90	7
Metronidazol	172	<u>128</u>	12	85	7
		147	25	85	7
Prednisolon	361.4	171	23	70	7
		<u>343.2</u>	2	70	7
		160	10	170	3
Benzylpenicillin	335	176	10	170	5
		<u>217</u>	10	170	3
		199.2	5	80	5
Simvastatin	419.3	<u>285.2</u>	5	80	5
		92	25	115	7
Sulfadoxin	311	107.9	25	115	7
		<u>156</u>	15	115	7
		92	28	80	7
Sulfametoksazol	254	108	20	85	7
		<u>156</u>	10	90	7
		154	24	110	7
Tetrasyklin	445	<u>410</u>	16	100	7
		427	6	110	7
		123.2	20	145	7
Trimetoprim	291.5	<u>261.1</u>	20	150	7

Tabell A 9 Massespektrometerparametere for internstandarder og gjenfinningsstandard

	Forløper-ion	Produkt-ion	Kollisjons-energi	Fragmentor	Celleakselerasjon-spenning
Koffein- ¹³ C ₃	198.3	138.2	10	100	7
Ibuprofen-D ₃	210	164	15	60	7
		122	17	60	7
		108.1	9	60	7
Metoprolol-D ₇	275.2	116.1	25	115	7
		72.1	18	115	7
		56.1	16	120	7
Sulfadoxin-D ₃	314	156	25	115	7
		107.9	25	115	7
		92	15	115	7

Tabell A 10 Gjennomsnittlig areal for de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved de 6 ulike metodene fra Tabell 3-3.

	Metode 1 [4]	Metode 2 [4]	Metode 3 [4]	Metode 4 [4]	Metode 5 [4]	Metode 6 [4]
Acetylsalisylsyre	86 235 ± 2,6 %	45 479 ± 10,0 %	45 896 ± 4,8 %	47 761 ± 1,8 %	53 294 ± 14,2 %	49 139 ± 6,0 %
Amlodipin	147 813 ± 1,9 %	96 159 ± 2,6 %	90 503 ± 1,1 %	92 951 ± 1,7 %	80 033 ± 1,5 %	64 133 ± 1,3 %
Benzylpenicillin	3 327 ± 2,5 %	2 575 ± 3,5 %	3 193 ± 5,1 %	8 327 ± 1,9 %	8 985 ± 2,7 %	7 542 ± 0,9 %
Ciprofloksacin	33 553 ± 0,9 %	26 700 ± 2,9 %	26 368 ± 1,4 %	19 509 ± 1,4 %	22 250 ± 6,1 %	20 783 ± 18,8 %
Ibuprofen	19 780 ± 2,7 %	7 423 ± 2,9 %	6 934 ± 2,6 %	8 984 ± 1,4 %	7 756 ± 1,2 %	7 806 ± 0,3 %
Ketoprofen	126 354 ± 1,8 %	69 624 ± 0,5 %	68 186 ± 1,5 %	72 264 ± 0,4 %	49 725 ± 1,2 %	47 931 ± 2,7 %
Koffein	48 235 ± 1,4 %	36 251 ± 2,0 %	38 674 ± 2,4 %	33 051 ± 1,3 %	34 244 ± 1,5 %	31 556 ± 2,5 %
Losartan	252 390 ± 0,8 %	159 822 ± 1,2 %	155 108 ± 0,4 %	167 539 ± 0,4 %	151 704 ± 0,3 %	119 646 ± 2,1 %
Metoprolol	61 008 ± 1,6 %	52 133 ± 6,0 %	53 490 ± 2,1 %	51 243 ± 1,3 %	50 202 ± 2,8 %	42 390 ± 3,9 %
Metronidazol	249 502 ± 1,3 %	198 590 ± 1,1 %	211 456 ± 1,5 %	221 208 ± 0,7 %	207 676 ± 1,5 %	194 110 ± 3,8 %
Prednisolon	146 972 ± 0,7 %	101 092 ± 1,3 %	106 727 ± 0,4 %	104 065 ± 0,6 %	99 373 ± 1,4 %	90 069 ± 1,0 %
Simvastatin	129 785 ± 0,7 %	101 246 ± 2,3 %	119 343 ± 0,8 %	121 447 ± 2,6 %	125 718 ± 0,3 %	95 224 ± 0,4 %
Sulfadoxin	353 405 ± 1,9 %	249 922 ± 0,6 %	261 567 ± 0,7 %	268 406 ± 0,1 %	254 827 ± 1,6 %	237 796 ± 0,4 %
Sulfametoksazol	79 380 ± 1,7 %	47 834 ± 0,9 %	49 154 ± 0,5 %	53 858 ± 0,3 %	49 246 ± 1,7 %	41 176 ± 1,4 %
Tetrasyklin	133 802 ± 1,4 %	81 224 ± 5,0 %	73 319 ± 5,3 %	59 598 ± 1,5 %	55 439 ± 0,7 %	45 230 ± 7,1 %
Trimetoprim	77 102 ± 1,9 %	68 414 ± 0,9 %	64 895 ± 3,2 %	54 085 ± 1,6 %	50 163 ± 7,0 %	53 668 ± 2,4 %

Tabell A 11 Gjennomsnittareal for de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved kolonnetemperatur fra 20 - 50°C

	20°C[4]	25°C[4]	30°C[4]	35°C[4]	40°C[4]	50°C[4]
Acetylsalisylsyre	90 149 ± 8,2 %	85 958 ± 3,5 %	76 750 ± 3,9 %	71 091 ± 3,7 %	70 173 ± 5,1 %	74 154 ± 3,1 %
Amlodipin	81 901 ± 47,8 %	139 600 ± 1,6 %	137 940 ± 0,7 %	98 061 ± 41,0 %	99 861 ± 42,0 %	110 892 ± 35,4 %
Benzylpenicillin	2 314 ± 25,9 %	3 045 ± 4,4 %	3 124 ± 1,7 %	2 641 ± 26,5 %	3 980 ± 7,2 %	4 778 ± 3,0 %
Ciprofloksacin	29 035 ± 3,7 %	28 408 ± 1,3 %	25 110 ± 19,9 %	26 147 ± 2,2 %	26 152 ± 22,3 %	23 454 ± 2,2 %
Ibuprofen	12 410 ± 43,4 %	12 034 ± 43,0 %	6745 ± 6,6 %	16 503 ± 1,3 %	14 132 ± 33,9 %	12 889 ± 37,1 %
Ketoprofen	134 393 ± 1,5 %	138 165 ± 1,9 %	135 655 ± 0,5 %	89 982 ± 57,3 %	50 355 ± 3,9 %	106 999 ± 32,8 %
Koffein	42 598 ± 3,7 %	49 431 ± 4,7 %	57 501 ± 6,7 %	60 408 ± 3,7 %	71 648 ± 8,1 %	83 080 ± 9,4 %
Losartan	232 784 ± 2,9 %	241 576 ± 0,8 %	237 618 ± 1,8 %	234 131 ± 1,2 %	103 203 ± 6,4 %	222 369 ± 2,7 %
Metoprolol	68 154 ± 0,8 %	68 922 ± 2,7 %	69 696 ± 2,0 %	70 203 ± 2,0 %	71 462 ± 2,9 %	67 401 ± 2,5 %
Metronidazol	247 486 ± 21,5 %	283 472 ± 3,3 %	286 364 ± 0,4 %	291 084 ± 3,1 %	298 875 ± 2,7 %	288 896 ± 2,9 %
Prednisolon	146 468 ± 3,1 %	152 332 ± 1,5 %	152 896 ± 1,2 %	152 995 ± 1,1 %	158 751 ± 1,8 %	155 358 ± 0,8 %
Simvastatin	150 660 ± 3,1 %	137 960 ± 5,1 %	111 936 ± 30,5 %	74 930 ± 45,5 %	54 608 ± 3,6 %	68 640 ± 49,2 %
Sulfadoxin	457 709 ± 2,2 %	448 551 ± 1,4 %	441 136 ± 1,5 %	434 677 ± 1,9 %	439 370 ± 1,2 %	421 380 ± 0,3 %
Sulfametoksazol	85 761 ± 2,0 %	84 217 ± 1,8 %	82 613 ± 1,1 %	76 992 ± 1,7 %	65 119 ± 3,0 %	68 456 ± 6,4 %
Tetrasyklin	112 935 ± 3,1 %	108 421 ± 2,1 %	109 582 ± 2,2 %	105 209 ± 1,1 %	102 901 ± 1,5 %	95 871 ± 1,5 %
Trimetoprim	84 223 ± 2,2 %	83 655 ± 3,8 %	80 344 ± 0,5 %	78 841 ± 2,3 %	78 619 ± 4,2 %	75 921 ± 5,8 %

Tabell A 12 Areal målt ved massespektrometeroptimaliseringen. Standardverdier benyttet ved testing: Gasstemperatur 325°C, Sheath gasstemperatur 375°C, Dysespenning 1000V, Kapillærspenning 3500V, nebulizertrykk 45psi og kolonneovnstemperatur 20°C.

Varierende parameter	Acetylsalisylsyre	Amlodipin	Benzympenicillin	Ciprofloksacin
Dysespenning: 1000 V	287 935	24 487	86 462	17 233
Dysespenning: 500 V	317 306	36 356	127 747	20 014,
Dysespenning: 0 V	341 648	40 645	119 662	29 672
Dysespenning: 1000 V*	335 552	27 114	91 777	13 256
Dysespenning: 500 V*	411 774	36 098	121 931	18 184
Dysespenning: 0 V*	472 392	38 252	112 015	26 897
Kapillærspenning: 2500 V	287 341	18 294	100 664	16 392
Kapillærspenning: 5000 V	273 317	28 170	103 169	17 354
Kapillærspenning: 3500 V	276 212	23 408	102 549	16 106
Kapillærspenning: 2500 V*	278 869	16 403	79 342	13 765
Kapillærspenning: 5000 V*	275 137	26 018	81 482	13 893
Kapillærspenning: 3500 V*	280 289	24 015	87 889	14 356
Nebulizertrykk: 10 psi	165 604	16 337	58 719	7 063
Nebulizertrykk: 20 psi	257 687	20 987	76 588	13 387
Nebulizertrykk: 30 psi	257 799	23 497	87 922	16 581
Nebulizertrykk: 40 psi	242 742	19 975	82 259	18 202
Nebulizertrykk: 50 psi	213 168	20 236	91 695	19 298
Gasstemperatur: 300 °C	227 621	34 115	82 371	18 472
Gasstemperatur: 325 °C	211 565	17 781	78 220	18 127
Gasstemperatur: 350 °C	204 684	8 501	77 949	18 152
Sheath gasstemperatur: 375 °C	207 739	17 360	74 770	17 428
Sheath gasstemperatur: 350 °C	195 780	16 335	68 785	17 117
Sheath gasstemperatur: 325 °C	185 332	16 463	64 382	15 888
Sheath gasstemperatur: 300 °C	176 544	15 981	62 01	14 084

* Nebulizertrykk 25psi.

Variierende parameter	Ketoprofen	Koffein	Losartan	Metronidazol	Prednisolon
Dysespenning: 1000 V	16 919	114 392	48 564	18 873	18 092
Dysespenning: 500 VV	19 329	83 614	70 579	25 048	24 681
Dysespenning: 0 V	12 391	95 751	62 059	28 336	31 513
Dysespenning: 1000 V*	18 369	127 412	50 497	18 764	16 565
Dysespenning: 500 V*	19 153	90 998	65 910	23 017	19 688
Dysespenning: 0 V*	11 674	85 307	57 341	23 897	17 819
Kapillærspenning: 2500 V	15 934	89 792	54 900	21 102	14 512
Kapillærspenning: 5000 V	18 615	87 143	59 103	18 951	15 638
Kapillærspenning: 3500 V	16 878	89 957	58 105	19 660	14 649
Kapillærspenning: 2500 V*	13 519	100 950	44 207	16 393	12 406
Kapillærspenning: 5000 V*	16 740	112 218	46 135	16 131	13 913
Kapillærspenning: 3500 V*	16 918	92 329	49 226	17 421	14 738
Nebulizertrykk: 10 psi	11 405	76 515	32 308	10 665	10 798
Nebulizertrykk: 20 psi	14 861	137 585	43 303	16 405	13 919
Nebulizertrykk: 30 psi	15 746	140 061	50 479	17 150	14 362
Nebulizertrykk: 40 psi	13 978	129 023	48 505	16 425	12 911
Nebulizertrykk: 50 psi	13 998	122 681	54 002	17 866	13 281
Gasstemperatur: 300 °C	13 234	123 070	49 690	16 391	13 544
Gasstemperatur: 325 °C	12 399	121 885	45 727	15 725	11 667
Gasstemperatur: 350 °C	11 967	124 381	46 193	15 281	8 469
Sheath gasstemperatur: 375 °C	11 717	116 761	44 477	15 269	11 254
Sheath gasstemperatur: 350 °C	10 805	108 677	40 061	13 961	10 129
Sheath gasstemperatur: 325 °C	10 927	99 488	37 243	12 953	9 422
Sheath gasstemperatur: 300 °C	10 217	91 598	37 036	11 863	8 518

*Nebulizertrykk 25psi

Varierende parameter	Simvastatin	Sulfadoxin	Sulfametoksazol	Tetrasyklin	Trimetoprim
Dysespenning: 1000 V	2 739 216	39 034	13 898	25 708	13 468
Dysespenning: 500 V	3 244 238	59 014	19 754	28 271	13 319
Dysespenning: 0V	2 749 801	74 486	20 758	26 828	20 444
Dysespenning: 1000 V*	2 323 314	39 751	14 500	16 534	13 559
Dysespenning: 500 V*	2 460 811	51 887	17 872	19 405	14 464
Dysespenning: 0 V*	1 756 641	61 646	16 845	16 928	20 984
Kapillærspenning: 2500 V	1 528 125	38 779	15 050	15 059	8 936
Kapillærspenning: 5000 V	2 120 806	37 652	14 251	16 938	15 077
Kapillærspenning: 3500 V	1 952 477	37 744	14 238	15 227	12 796
Kapillærspenning: 2500 V*	1 429 869	35 502	11 769	14 368	15 287
Kapillærspenning: 5000 V*	1 881 248	32 759	11 457	14 877	15 358
Kapillærspenning: 3500 V*	1 966 897	35 842	13 068	15 019	13 486
Nebulizertrykk: 10 psi	1 177 327	21 504	8 036	10 371	10 209
Nebulizertrykk: 20 psi	1 741 680	31 752	11 469	12 512	13 956
Nebulizertrykk: 30 psi	1 866 220	34 150	12 417	13 762	16 602
Nebulizertrykk: 40 psi	1 627 366	30 508	11 255	13 039	15 659
Nebulizertrykk: 50 psi	1 620 321	32 038	12 042	13 439	13 994
Gasstemperatur: 300 °C	2 012 275	29 603	10 741	12 174	16 439
Gasstemperatur: 325 °C	1 514 351	28 492	10 884	11 753	17 362
Gasstemperatur: 350 °C	501 241	28 395	10 781	11 094	15 620
Sheath gasstemperatur: 375 °C	1 449 184	25 335	9 965	10 103	15 725
Sheath gasstemperatur: 350 °C	1 364 732	23 459	9 321	8 947	16 153
Sheath gasstemperatur: 325 °C	1 345 865	21 358	8 618	8 431	14 820
Sheath gasstemperatur: 300 °C	1 361 897	19 183	8 148	7 730	15 386

* Nebulizertrykk 25psi.

Opprensning og ekstraksjon

Tabell A 13 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ubuffret metode, EN-metoden og AOAC-metoden. $MgSO_4$ er benyttet som tørkesalt.

		Ubuffret [3]	EN-metoden [3]	AOAC-metoden [3]
Acetylsalisylsyre	S - prøve	11 248 ± 9,4 %	11 008 ± 7,2 %	23 417 ± 21,8 %
	M - prøve	14 752 ± 16,2 %	16 655 ± 19,3 %	30 784 ± 16,2 %
Amlodipin	S - prøve	61 528 ± 2,3 %	70 211 ± 2,0 %	77 526 ± 3,7 %
	M - prøve	52 011 ± 7,7 %	62 039 ± 0,8 %	70 455 ± 5,9 %
Benzylpenicillin	S - prøve	4 079 ± 27,5 %	3 434 ± 7,6 %	3 493 ± 3,50 %
	M - prøve	1 537 ± 10,4 %	2 114 ± 39,6 %	2 556 ± 26,8 %
Ciprofloksacin	S - prøve	-*	3 981 ± 13,2 %	235 ± 8,3 %
	M - prøve	-*	-*	-*
Ibuprofen	S - prøve	88 713 ± 12,1 %	91 719 ± 8,5 %	84 415 ± 7,7 %
	M - prøve	36 271 ± 9,8 %	53 858 ± 34,1 %	62 183 ± 22,0 %
Ketoprofen	S - prøve	30 182 ± 4,4 %	32 614 ± 2,8 %	27 452 ± 1,0 %
	M - prøve	8 212 ± 18,3 %	15 598 ± 56,6 %	17 005 ± 39,1 %
Koffein	S - prøve	42 287 ± 7,8 %	35 205 ± 13,9 %	37 467 ± 22,3 %
	M - prøve	35 622 ± 13,3 %	35 660 ± 7,8 %	40 364 ± 13,6 %
Losartan	S - prøve	60 720 ± 20,4 %	64 837 ± 13,1 %	58 844 ± 9,6 %
	M - prøve	35 227 ± 6,3 %	46 242 ± 13,6 %	51 872 ± 10,3 %
Metronidazol	S - prøve	13 432 ± 33,6 %	14 243 ± 32,8 %	8 375 ± 25,1 %
	M - prøve	10 317 ± 19,1 %	11 090 ± 26,2 %	9 919 ± 19,1 %
Prednisolon	S - prøve	18 956 ± 23,9 %	20 369 ± 14,4 %	18 316 ± 10,4 %
	M - prøve	21 682 ± 11,4 %	23 785 ± 8,7 %	21 539 ± 11,5 %
Simvastatin	S - prøve	55 563 ± 8,2 %	55 841 ± 8,6 %	52 214 ± 7,4 %
	M - prøve	60 904 ± 6,2 %	58 376 ± 6,5 %	60 050 ± 10,8 %
Sulfadoxin	S - prøve	54 397 ± 16,0 %	60 464 ± 4,1 %	45 597 ± 1,1 %
	M - prøve	36 925 ± 3,3 %	44 855 ± 21,2 %	38 892 ± 11,5 %
Sulfametoksazol	S - prøver	20 649 ± 11,1 %	22 304 ± 6,0 %	17 292 ± 1,8 %
	M - prøver	11 692 ± 5,7 %	15 554 ± 27,2 %	14 089 ± 17,5 %
Tetrasyklin	S - prøver	-*	2 414 ± 15,6 %	2 451 ± 4,7 %
	M - prøver	-*	-*	-*
Trimetoprim	S - prøver	10 253 ± 5,0 %	9 255 ± 18,1 %	8 171 ± 24,5 %
	M - prøver	7 524 ± 14,7 %	7 200 ± 7,6 %	7 435 ± 11,3 %

* Ikke målbare verdier

Tabell A 14 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ubufret metode, EN-metoden og AOAC-metoden. Na_2SO_4 er benyttet som tørkesalt.

		Ubufret [3]	EN-metoden [3]	AOAC-metoden [3]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	16 142 ± 14,5 %	17 496 ± 15,9 %	31 985 ± 14,7 %
	M -prøve	16 298 ± 12,6 %	18 358 ± 19,0 %	34 972 ± 17,6 %
Amlodipin	S -prøve	54 099 ± 6,8 %	60 613 ± 6,9 %	64 792 ± 11,4 %
	M -prøve	49 781 ± 9,6 %	59 835 ± 6,2 %	65 171 ± 4,4 %
Benzylpenicillin	S -prøve	3 945 ± 9,0 %	3 487 ± 1,4 %	3 801 ± 16,2 %
	M -prøve	3 122 ± 13,6 %	3 052 ± 6,1 %	2 661 ± 6,3 %
Ciprofloksacin	S -prøve	9 303 ± 19,9 %	10 900 ± 18,6 %	1 294 ± 9,5 %
	M -prøve	5 455 ± 30,7 %	7 560 ± 36,6 %	1 228 ± 5,6 %
Ibuprofen	S -prøve	108 323 ± 10,5 %	110 513 ± 6,3 %	95 478 ± 5,6 %
	M -prøve	101 449 ± 6,0 %	103 036 ± 5,0 %	88 793 ± 8,5 %
Ketoprofen	S -prøve	39 022 ± 7,1 %	40 432 ± 6,8 %	26 324 ± 5,3 %
	M -prøve	33 479 ± 1,6 %	34 285 ± 7,5 %	23 798 ± 8,8 %
Koffein	S -prøve	48 071 ± 10,4 %	54 612 ± 19,8 %	46 915 ± 17,4 %
	M -prøve	50 068 ± 25,9 %	55 795 ± 9,0 %	56 364 ± 14,2 %
Losartan	S -prøve	92 679 ± 15,6 %	96 514 ± 13,6 %	93 807 ± 8,9 %
	M -prøve	86 966 ± 8,3 %	87 561 ± 6,4 %	89 106 ± 12,3 %
Metronidazol	S -prøve	19 563 ± 32,8 %	23 567 ± 20,3 %	14 439 ± 18,8 %
	M -prøve	19 482 ± 26,4 %	24 224 ± 17,4 %	15 690 ± 20,6 %
Prednisolon	S -prøve	24 712 ± 19,1 %	26 433 ± 15,3 %	26 463 ± 8,9 %
	M -prøve	25 577 ± 9,4 %	27 100 ± 7,0 %	26 926 ± 12,7 %
Simvastatin	S -prøve	90 295 ± 16,7 %	93 732 ± 15,4 %	99 381 ± 9,5 %
	M -prøve	93 098 ± 11,4 %	95 690 ± 7,4 %	101 251 ± 12,1 %
Sulfadoxin	S -prøve	57 654 ± 7,2 %	58 243 ± 6,8 %	19 769 ± 7,9 %
	M -prøve	48 599 ± 1,7 %	50 160 ± 6,7 %	17 931 ± 10,0 %
Sulfametoksazol	S -prøver	25 990 ± 6,6 %	26 061 ± 6,8 %	12 395 ± 6,5 %
	M -prøver	22 159 ± 2,5 %	22 777 ± 8,5 %	11 161 ± 9,7 %
Tetrasyklin	S -prøver	5 394 ± 20,3 %	8 097 ± 6,4 %	5 039 ± 3,4 %
	M -prøver	3 577 ± 27,3 %	5 810 ± 18,5 %	3 711 ± 7,2 %
Trimetoprim	S -prøver	12 085 ± 11,4 %	11 883 ± 3,8 %	11 268 ± 11,0 %
	M -prøver	11 602 ± 14,8 %	11 679 ± 20,3 %	11 565 ± 7,7 %

Tabell A 15 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved EN-metoden hvor 0,1g/mL Na₂EDTA er tilsatt. Både MgSO₄ og Na₂SO₄ er benyttet som tørkesalt.

		MgSO ₄ [6]	Na ₂ SO ₄ [6]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	8 653 ± 19,9 %	5 439 ± 6,6 %
	M -prøve	22 018 ± 10,5 %	7 969 ± 8,2 %
Amlodipin	S -prøve	114 793 ± 17,1 %	130 848 ± 5,3 %
	M -prøve	111 398 ± 14,4 %	125 279 ± 5,4 %
Benzylpenicillin	S -prøve	1 823 ± 11,6 %	2 257 ± 14,4 %
	M -prøve	1 044 ± 25,4 %	1 783 ± 19,0 %
Ciprofloksacin	S -prøve	31 843 ± 7,7 %	60 427 ± 6,7 %
	M -prøve	-*	26 081 ± 10,7 %
Ibuprofen	S -prøve	123 277 ± 10,6 %	140 007 ± 4,2 %
	M -prøve	48 561 ± 13,7 %	125 291 ± 5,5 %
Ketoprofen	S -prøve	64 790 ± 15,8 %	75 599 ± 3,5 %
	M -prøve	18 429 ± 15,6 %	61 234 ± 5,8 %
Koffein	S -prøve	280 561 ± 13,9 %	282 602 ± 4,9 %
	M -prøve	281 081 ± 13,4 %	295 939 ± 7,6 %
Losartan	S -prøve	132 393 ± 15,7 %	156 499 ± 3,8 %
	M -prøve	74 079 ± 13,3 %	139 257 ± 4,7 %
Metronidazol	S -prøve	59 470 ± 21,2 %	62 316 ± 6,6 %
	M -prøve	43 677 ± 14,7 %	48 083 ± 10,3 %
Prednisolon	S -prøve	53 138 ± 15,9 %	60 718 ± 6,8 %
	M -prøve	51 446 ± 13,8 %	58 019 ± 6,1 %
Simvastatin	S -prøve	159 331 ± 16,8 %	182 954 ± 6,8 %
	M -prøve	159 660 ± 14,5 %	171 673 ± 6,2 %
Sulfadoxin	S -prøve	110 147 ± 15,8 %	126 328 ± 4,2 %
	M -prøve	65 890 ± 14,5 %	101 053 ± 6,5 %
Sulfametoksazol	S -prøver	40 544 ± 15,6 %	47 508 ± 4,0 %
	M -prøver	21 940 ± 14,0 %	39 372 ± 5,6 %
Tetrasyklin	S -prøver	6 069 ± 16,0 %	21 141 ± 4,1 %
	M -prøver	-*	6 522 ± 16,6 %
Trimetoprim	S -prøver	56 558 ± 18,3 %	55 282 ± 6,5 %
	M -prøver	46 381 ± 15,4 %	52 940 ± 4,8 %

* Ikke målbare verdier

Tabell A 16 Gjennomsnittlig areal ved EN-metoden og EN-metoden med tilsatt 0,1g/mL Na₂EDTA. Na₂SO₄ og MgSO₄ er begge benyttet som tørkesalt. Med Na₂SO₄ er også ubufret metode testet.

		MgSO ₄		Na ₂ SO ₄		
		EN- metoden [2]	Na ₂ EDTA [2]	Ubufret- metode [2]	EN-metoden* [2]	Na ₂ EDTA [2]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	77 825	69 376	46 850	52 160	56 228
	M -prøve	123 109	124 017	58 409	65 425	65 263
Amlodipin	S -prøve	104 485	110 802	115 129**	104 547	109 026
	M -prøve	110 965	113 688	113 764	105 834	105 586
Benzylpenicillin	S -prøve	21 213	21 241	21 613	21 288	20 258
	M -prøve	7 003	6 572	19 691	15 282	15 823
Ciprofloksacin	S -prøve	37 491	42 220	52 292	69 746	72 049
	M -prøve	-***	-***	24 114	24 943	27 231
Ibuprofen	S -prøve	15 768	16 179	17 384	17 550	17 635
	M -prøve	5 339	5 102	15 991	13 518	14 024
Ketoprofen	S -prøve	72 835	75 117	77 874	80 307	79 764
	M -prøve	21 618	20 307	71 701	57 084	62 167
Koffein	S -prøve	297 025	297 842	258 254	286 993	282 128
	M -prøve	283 742	267 195	251 645	230 485	256 471
Losartan	S -prøve	185 095	192 884	195 789	203 344	200 9013
	M -prøve	102 086	94 679	194 843	159 979	171 443
Metronidazol	S -prøve	74 371	81 313	53 847	63 306	61 424
	M-prøve	46 330	45 190	49 846	37 431	45 254
Prednisolon	S -prøve	55 830	56 951	57 280	60 783	60 288
	M -prøve	54 586	51 712	59 948	52 570	55 463
Simvastatin	S -prøve	174 864	179 491	169 710	166 809	170 443
	M -prøve	173 518	169 239	178 840	145 782	157 079
Sulfadoxin	S -prøve	122 390	125 590	132 530	134 565	131 740
	M -prøve	69 193	64 495	113 170	93 137	101 792
Sulfametoksazol	S -prøver	47 892	48 405	50 737	52 720	52 082
	M -prøver	24 660	22 517	45 778	37 877	40 437
Tetrasyklin	S -prøver	6 955	7 602	10 098	20 280	20 206
	M -prøver	-***	-***	5 884	4 186	4 961
Trimetoprim	S -prøver	57 228	52 920	53 197	58 467	61 542
	M -prøver	54 220	53 197	52 760	47 932	53 697

* Den ene M-prøven var en tydelig uteligger, hvor ingen av toppen kom ved forventet retensjonstid, og disse ble dermed valgt vekk.

** Den ene prøven var en uteligger, med et areal på mindre enn 5 % av den parallelle prøven, og ble dermed valgt vekk

***Ikke målbare verdier

Tabell A 17 Areal ved EN-metoden og EN-metoden med tilsatt 0,1g/mL Na₂EDTA. Na₂SO₄ og MgSO₄ er begge benyttet som tørkesalt. Med Na₂SO₄ er også ubufret metode testet. S-prøve er delprøve som ikke har gått gjennom dSPE. M-prøve er delprøve gått gjennom dSPE

		Acetylsalisylsyre	Amlodipin	Benzylpenicillin	Ciprofloksacin	Ibuprofen
EN, MgSO ₄	S-prøve	83 982	97 798	21 829	35 615	15 534
		71 668	111 171	20 596	39 368	16 003
	M-prøve	131 268	109 213	6 739		5 039
		114 951	112 718	7 267		5 640
Na ₂ EDTA, MgSO ₄	S-prøve	73 332	106 733	21 681	43 217	16 093
		65 421	114 872	20 801	41 224	16 266
	M-prøve	129 670	111 821	6 624		5 040
		118 363	115 554	6 521		5 165
Ubufret, Na ₂ SO ₄	S-prøve	46 858	115 129	21 240	46 839	16 839
		46 842	3 953*	21 986	57 745	17 929
	M-prøve	59 719	111 750	20 005	22 528	16 157
		57 099	115 777	19 376	25 701	15 825
EN, Na ₂ SO ₄	S-prøve	53 241	112 592	21 373	67 568	17 156
		51 081	96 501	21 203	71 925	17 944
	M-prøve	22 703*	107 566*	581*	-*	20 404*
		65 425	105 834	15 282	24 943	13 518
Na ₂ EDTA, Na ₂ SO ₄	S-prøve	54 681	106 915	20 305	71 292	17 391
		57 775	111 137	20 211	72 807	17 878
	M-prøve	65 809	97 151	16 441	27 661	14 348
		64 717	114 021	15 204	26 801	13 701

*Prøven er en uteligger, med et areal som skiller seg tydelig fra de andre prøvene, og velges vekk i videre arbeid

		Ketoprofen	Koffein	Losartan	Metronidazol	Prednisolon	Simvastatin
EN, MgSO ₄	S-prøve	72 153	299 547	187 380	75 291	53 916	171 233
		73 516	294 503	182 810	73 450	57 744	178 494
	M-prøve	20 712	290 030	99 314	48 820	53 851	172 550
		22 525	277 455	104 857	43 840	55 320	174 485
Na ₂ EDTA, MgSO ₄	S-prøve	75 572	300 181	194 852	88 159	55 762	171 078
		74 663	295 503	190 915	74 466	58 142	187 903
	M-prøve	19 391	266 094	93 064	45 159	50 148	161 453
		21 222	268 297	96 294	45 221	53 275	177 026
Ubufret, Na ₂ SO ₄	S-prøve	74 068	252 836	188 588	54 610	53 314	155 363
		81 680	263 672	202 990	53 083	61 246	184 057
	M-prøve	72 826	261 937	193 542	51 824	60 007	178 820
		70 576	241 353	196 144	47 868	59 890	178 860
EN, Na ₂ SO ₄	S-prøve	80 456,	289 952	203 710	64 574	59 125	164 590
		80 158	284 033	202 979	62 038	62 440	169 028
	M-prøve	5 451*	94*	22 408*	18 064*	2 700*	192 088*
		57 084	230 485	159 979	37 431	52 570	145 782
Na ₂ EDTA, Na ₂ SO ₄	S-prøve	79 194	283 056	204 391	65 676	59 269	164 170
		80 333	281 199	197 412	57 173	61 307	176 715
	M-prøve	63 552	278 198	176 310	52 121	56 636	158 719
		60 781	234 744	166 576	38 388	54 291	155 438

* Prøven er en tydelig uteligger, med et areal som skiller de tydelig fra de andre prøvene, og er derfor valgt vekk videre.

		Sulfadoxin	Sulfametoksazol	Tetrasyklin	Trimetoprim
EN, MgSO ₄	S-prøve	124 288	47 934	6 546	58 987
	M-prøve	120 492	47 850	7 365	55 468
		66 639	23 229		53 485
		71 747	26 090		54 955
Na ₂ EDTA, MgSO ₄	S-prøve	127 773	48 819	8 185	60 572
	M-prøve	123 407	47 992	7 019	45 268
		64 831	22 292		54 967
		64 159	22 743		51 427
Ubufret, Na ₂ SO ₄	S-prøve	125 514	47 854	7 286	56 669
	M-prøve	139 547	53 621	12 911	48 850
		116 247	46 514	5 812	54 911
		110 093	45 041	5 957	42 426
EN, Na ₂ SO ₄	S-prøve	133 246	51 374	20 471	59 801
	M-prøve	135 884	54 066	20 090	57 133
		4 866*	1 765*	-*	-*
		93 137	37 877	4 186	47 932
Na ₂ EDTA, Na ₂ SO ₄	S-prøve	131 840	52 046	19 893	60 185
	M-prøve	131 639	52 118	20 520	62 899
		104 908	41 737	5 096	57 207
		98 675	39 137	4 826	50 188

* Prøven er en tydelig uteligger, med et areal som ligger langt fra de resterende prøvene, og er derfor valgt bort i videre arbeid

Tabell A 18 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ACN og MeOH som ekstraksjonsmiddel.

		ACN [3]	MeOH [6]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	7 959 ± 8,8 %	102 ± 50,6 %
	M-prøve	9 610 ± 8,8 %	61 ± 42,2 %
Amlodipin	S-prøve	122 258 ± 2,5 %	61 017 ± 10,8 %
	M-prøve	123 203 ± 4,7 %	58 965 ± 11,1 %
Benzylpenicillin	S-prøve	4 672 ± 82,4 %	10 211 ± 47,8 %
	M-prøve	2 308 ± 13,5 %	22 409 ± 39,4 %
Ciprofloksacin	S-prøve	42 591 ± 14,1 %	40 329 ± 11,5 %
	M-prøve	23 488 ± 5,0 %	41 487 ± 6,4 %
Ibuprofen	S-prøve	16 674 ± 4,1 %	9 075 ± 2,6 %
	M-prøve	14 993 ± 6,2 %	8 846 ± 2,9 %
Ketoprofen	S-prøve	65 498 ± 0,9 %	35 970 ± 2,1 %
	M-prøve	59 276 ± 5,0 %	35 838 ± 3,8 %
Koffein	S-prøve	239 122 ± 6,4 %	134 719 ± 4,6 %
	M-prøve	245 114 ± 7,6 %	128 173 ± 5,2 %
Losartan	S-prøve	168 016 ± 4,7 %	94 405 ± 4,4 %
	M-prøve	162 483 ± 4,4 %	92 681 ± 4,2 %
Metronidazol	S-prøve	46 338 ± 7,0 %	82 102 ± 6,5 %
	M-prøve	47 885 ± 14,7 %	79 865 ± 8,6 %
Prednisolon	S-prøve	57 167 ± 1,6 %	31 151 ± 4,0 %
	M-prøve	56 437 ± 3,3 %	30 738 ± 1,9 %
Simvastatin	S-prøve	188 336 ± 4,7 %	88 887 ± 15,4 %
	M-prøve	186 765 ± 1,7 %	38 549 ± 29,1 %
Sulfadoxin	S-prøve	136 637 ± 5,8 %	69 309 ± 2,9 %
	M-prøve	121 872 ± 8,6 %	66 358 ± 1,7 %
Sulfametoksazol	S-prøve	44 159 ± 2,7 %	24 119 ± 2,8 %
	M-prøve	40 581 ± 5,0 %	23 193 ± 2,8 %
Tetrasyklin	S-prøve	13 140 ± 32,2 %	33 659 ± 26,0 %
	M-prøve	6 584 ± 18,2 %	34 458 ± 11,1 %
Trimetoprim	S-prøve	58 075 ± 3,3 %	37 440 ± 5,4 %
	M-prøve	62 390 ± 4,8 %	37 763 ± 7,5 %

Tabell A 19 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved ACN med og uten ulike tilsetninger som ekstraksjonsmiddel.

		1 % V/V maursyre i ACN [4]	1 % V/V eddiksyre i ACN [4]	ACN [4]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	3 172 ± 9,6 %	3 543 ± 28,3 %	3 713 ± 21,8 %
	M-prøve	8 686 ± 18,7 %	7 227 ± 8,8 %	5 001 ± 18,3 %
Amlodipin	S-prøve	124 711 ± 11,6 %	132 563 ± 8,9 %	132 735 ± 5,3 %
	M-prøve	123 912 ± 7,7 %	132 651 ± 5,4 %	125 770 ± 13,0 %
Benzylpenicillin	S-prøve	963 ± 13,6 %	1 304 ± 34,6 %	3 572 ± 56,6 %
	M-prøve	1 034 ± 11,4 %	1 469 ± 9,5 %	1 118 ± 43,7 %
Ciprofloksacin	S-prøve	68 494 ± 12,4 %	64 865 ± 18,9 %	58 378 ± 17,2 %
	M-prøve	67 725 ± 7,3 %	65 359 ± 6,6 %	22 606 ± 22,7 %
Ibuprofen	S-prøve	13 113 ± 8,3 %	13 554 ± 6,2 %	13 808 ± 5,4 %
	M-prøve	13 508 ± 5,4 %	13 753 ± 4,0 %	11 918 ± 17,1 %
Ketoprofen	S-prøve	61 642 ± 10,9 %	63 066 ± 7,5 %	64 208 ± 5,1 %
	M-prøve	60 834 ± 6,8 %	64 192 ± 5,2 %	51 114 ± 14,4 %
Koffein	S-prøve	254 704 ± 5,8 %	254 722 ± 3,3 %	261 356 ± 1,4 %
	M-prøve	248 748 ± 3,0 %	257 569 ± 2,5 %	244 751 ± 12,4 %
Losartan	S-prøve	190 005 ± 9,4 %	196 914 ± 7,0 %	195 731 ± 2,6 %
	M-prøve	184 121 ± 4,7 %	197 155 ± 4,7 %	175 401 ± 16,3 %
Metronidazol	S-prøve	42 018 ± 21,3 %	50 020 ± 12,4 %	48 771 ± 3,8 %
	M-prøve	29 928 ± 2,7 %	38 089 ± 4,9 %	41 783 ± 22,6 %
Prednisolon	S-prøve	51 051 ± 12,5 %	55 250 ± 9,9 %	55 385 ± 5,76 %
	M-prøve	52 280 ± 6,5 %	55 549 ± 7,0 %	51 975 ± 11,0 %
Simvastatin	S-prøve	155 365 ± 17,7 %	175 397 ± 12,6 %	182 693 ± 3,1 %
	M-prøve	167 620 ± 5,9 %	188 659 ± 3,9 %	176 094 ± 18,6 %
Sulfadoxin	S-prøve	139 917 ± 8,8 %	137 827 ± 8,8 %	136 376 ± 7,5 %
	M-prøve	131 086 ± 7,5 %	137 254 ± 5,9 %	108 036 ± 13,0 %
Sulfametoksazol	S-prøve	46 168 ± 7,9 %	47 507 ± 7,2 %	47 814 ± 4,9 %
	M-prøve	44 858 ± 7,0 %	47 329 ± 4,9 %	39 092 ± 14,6 %
Tetrasyklin	S-prøve	66 295 ± 8,3 %	45 672 ± 48,6 %	22 822 ± 80,1 %
	M-prøve	36 318 ± 5,0 %	38 033 ± 10,6 %	3 852 ± 44,4 %
Trimetoprim	S-prøve	53 136 ± 9,5 %	51 226 ± 5,2 %	53 010 ± 6,9 %
	M-prøve	51 378 ± 3,1 %	50 003 ± 6,8 %	48 726 ± 8,6 %

Tabell A 20 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende ekstraksjonstid.

		1 minutt [4]	5 minutter [4]	10 minutter [4]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	6 414 ± 21,5 %	6 362 ± 8,8 %	6 257 ± 6,45 %
	M -prøve	11 645 ± 12,3 %	12 048 ± 11,1 %	11 604 ± 7,3 %
Amlodipin	S -prøve	109 311 ± 8,5 %	120 610 ± 9,6 %	110 031 ± 7,7 %
	M -prøve	113 770 ± 3,4 %	122 605 ± 5,4 %	110 973 ± 6,9 %
Benzylpenicillin	S -prøve	47 887 ± 9,1 %	51 853 ± 7,6 %	47 532 ± 6,8 %
	M -prøve	48 378 ± 2,7 %	51 570 ± 4,7 %	45 246 ± 4,9 %
Ciprofloksacin	S -prøve	47 920 ± 13,3 %	51 565 ± 9,8 %	48 950 ± 9,5 %
	M -prøve	47 952 ± 4,2 %	51 107 ± 7,5 %	46 824 ± 9,0 %
Ibuprofen	S -prøve	15 814 ± 9,9 %	16 577 ± 10,1 %	16 162 ± 9,5 %
	M -prøve	16 681 ± 7,0 %	17 113 ± 7,2 %	15 981 ± 5,7 %
Ketoprofen	S -prøve	66 078 ± 9,5 %	71 568 ± 9,6 %	67 977 ± 9,0 %
	M -prøve	69 792 ± 3,0 %	74 012 ± 4,5 %	66 942 ± 7,3 %
Koffein	S -prøve	127 152 ± 8,1 %	135 362 ± 2,9 %	126 480 ± 3,9 %
	M -prøve	134 322 ± 6,8 %	140 896 ± 6,7 %	127 904 ± 2,1 %
Losartan	S -prøve	176 312 ± 8,1 %	193 237 ± 7,7 %	176 992 ± 6,3 %
	M -prøve	184 303 ± 2,3 %	196 898 ± 2,0 %	178 171 ± 5,7 %
Metronidazol	S -prøve	60 402 ± 7,5 %	66 849 ± 4,5 %	60 896 ± 4,1 %
	M -prøve	57 556 ± 9,0 %	60 009 ± 8,6 %	53 826 ± 3,9 %
Prednisolon	S -prøve	54 955 ± 12,6 %	60 646 ± 11,30 %	56 811 ± 10,0 %
	M -prøve	60 289 ± 3,5 %	64 395 ± 4,0 %	58 515 ± 8,6 %
Simvastatin	S -prøve	125 871 ± 11,6 %	140 806 ± 12,2 %	126 098 ± 9,7 %
	M -prøve	137 754 ± 3,2 %	151 273 ± 5,9 %	131 823 ± 8,4 %
Sulfadoxin	S -prøve	183 785 ± 8,3 %	203 559 ± 9,3 %	187 300 ± 6,6 %
	M -prøve	189 802 ± 1,7 %	202 334 ± 4,1 %	179 570 ± 5,8 %
Sulfametoksazol	S -prøver	41 682 ± 8,4 %	45 535 ± 11,2 %	42 630 ± 8,2 %
	M -prøver	44 828 ± 2,9 %	46 949 ± 3,8 %	43 565 ± 7,5 %
Tetrasyklin	S -prøver	50 668 ± 12,4 %	54 848 ± 6,5 %	51 076 ± 10,4 %
	M -prøver	26 554 ± 33,0 %	29 119 ± 40,0 %	27 492 ± 34,1 %
Trimetoprim	S -prøver	64 988 ± 8,4 %	70 368 ± 5,7 %	64 067 ± 8,0 %
	M -prøver	67 990 ± 10,4 %	72 732 ± 10,6 %	63 802 ± 6,0 %

Tabell A 21 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende sentrifugeringsstid.

		5 minutter [4]	10 minutter [4]	15 minutter [4]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	5 836 ± 23,6 %	6 039 ± 15,0 %	5 637 ± 16,5 %
	M -prøve	11 068 ± 14,4 %	11 422 ± 8,2 %	10 972 ± 12,5 %
Amlodipin	S -prøve	134 935 ± 12,3 %	128 139 ± 8,2 %	126 579 ± 7,8 %
	M -prøve	127 135 ± 7,7 %	125 949 ± 7,3 %	120 202 ± 8,1 %
Benzylpenicillin	S -prøve	6 109 ± 9,7 %	5 874 ± 4,5 %	5 757 ± 7,3 %
	M -prøve	6 148 ± 6,3 %	5 849 ± 3,7 %	5 747 ± 6,4 %
Ciprofloksacin	S -prøve	75 337 ± 13,4 %	75 433 ± 14,3 %	74 321 ± 9,1 %
	M -prøve	66 553 ± 7,7 %	68 798 ± 12,1 %	64 119 ± 6,0 %
Ibuprofen	S -prøve	15 819 ± 8,8 %	15 487 ± 2,7 %	15 408 ± 2,0 %
	M -prøve	15 147 ± 2,5 %	14 690 ± 3,4 %	14 715 ± 2,0 %
Ketoprofen	S -prøve	77 478 ± 10,3 %	75 430 ± 6,8 %	73 697 ± 4,8 %
	M -prøve	73 210 ± 4,8 %	72 757 ± 5,5 %	70 676 ± 5,2 %
Koffein	S -prøve	139 042 ± 10,0 %	138 156 ± 7,4 %	138 094 ± 7,2 %
	M -prøve	138 180 ± 6,6 %	140 093 ± 8,7 %	135 278 ± 6,6 %
Losartan	S -prøve	221 870 ± 11,5 %	213 605 ± 7,9 %	210 855 ± 6,1 %
	M -prøve	207 083 ± 5,7 %	207 191 ± 5,1 %	198 984 ± 5,0 %
Metronidazol	S -prøve	75 902 ± 23,4 %	75 482 ± 20,8 %	75 189 ± 19,8 %
	M -prøve	57 487 ± 15,3 %	57 770 ± 17,7 %	54 427 ± 13,5 %
Prednisolon	S -prøve	72 733 ± 13,6 %	71 063 ± 9,1 %	70 387 ± 5,7 %
	M -prøve	70 890 ± 6,1 %	70 419 ± 6,3 %	68 187 ± 6,1 %
Simvastatin	S -prøve	188 614 ± 12,4 %	167 542 ± 11,0 %	167 190 ± 8,2 %
	M -prøve	179 779 ± 6,6 %	163 144 ± 4,6 %	162 835 ± 6,2 %
Sulfadoxin	S -prøve	263 511 ± 12,5 %	252 103 ± 8,9 %	252 554 ± 10,6 %
	M -prøve	240 314 ± 8,7 %	236 391 ± 9,1 %	228 127 ± 7,5 %
Sulfametoksazol	S -prøver	58 955 ± 11,9 %	57 325 ± 6,7 %	56 617 ± 7,2 %
	M -prøver	56 390 ± 6,0 %	55 749 ± 7,4 %	53 556 ± 5,1 %
Tetrasyklin	S -prøver	48 580 ± 17,5 %	48 013 ± 21,9 %	40 527 ± 18,5 %
	M -prøver	16 881 ± 29,1 %	18 555 ± 55,3 %	12 699 ± 26,7 %
Trimetoprim	S -prøver	76 166 ± 12,2 %	76 553 ± 11,3 %	77 272 ± 9,4 %
	M -prøver	74 976 ± 6,3 %	79 113 ± 6,7 %	75 122 ± 5,3 %

Tabell A 22 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 valgte legemidlene samt sulfadoxin, ved ulike sentrifugeringshastigheter. For hva hastighetene i rpm tilsvarer i g, se Tabell 3-4.

		1500 rpm [4]	3000 rpm [4]	4500 rpm [4]
Acetylsalisylsyre	S -prøve	5 918 ± 19,4 %	6 216 ± 5,8 %	5 653 ± 19,4 %
	M -prøve	10 938 ± 5,0 %	11 704 ± 5,1 %	11 839 ± 11,3 %
Amlodipin	S -prøve	120 380 ± 6,5 %	99 841 ± 10,8 %	104 665 ± 9,7 %
	M -prøve	113 739 ± 14,8 %	92 684 ± 11,5 %	105 247 ± 10,2 %
Benzylpenicillin	S -prøve	15 979 ± 7,9 %	14 107 ± 8,3 %	11 236 ± 10,8 %
	M -prøve	14 691 ± 11,1 %	13 182 ± 10,7 %	10 643 ± 4,4 %
Ciprofloksacin	S -prøve	61 609 ± 5,6 %	62 464 ± 8,1 %	61 653 ± 13,2 %
	M -prøve	55 363 ± 13,6 %	56 174 ± 12,6 %	59 892 ± 3,7 %
Ibuprofen	S -prøve	16 632 ± 9,7 %	16 936 ± 11,3 %	16 422 ± 7,9 %
	M -prøve	15 999 ± 10,6 %	16 596 ± 13,5 %	17 134 ± 6,6 %
Ketoprofen	S -prøve	72 524 ± 6,0 %	74 754 ± 5,9 %	71 632 ± 9,6 %
	M -prøve	67 979 ± 8,6 %	71 270 ± 9,9 %	73 717 ± 4,0 %
Koffein	S -prøve	135 429 ± 14,5 %	140 077 ± 12,3 %	134 154 ± 15,6 %
	M -prøve	131 170 ± 12,0 %	134 130 ± 5,8 %	136 591 ± 6,6 %
Losartan	S -prøve	163 370 ± 5,6 %	156 790 ± 8,8 %	152 004 ± 8,4 %
	M -prøve	153 324 ± 13,8 %	150 196 ± 9,8 %	155 110 ± 8,0 %
Metronidazol	S -prøve	69 355 ± 28,8 %	70 721 ± 31,7 %	65 532 ± 27,8 %
	M -prøve	53 438 ± 19,6 %	53 193 ± 7,9 %	53 611 ± 7,61 %
Prednisolon	S -prøve	61 085 ± 6,2 %	61 858 ± 6,4 %	60 271 ± 11,2 %
	M -prøve	58 859 ± 8,1 %	61 927 ± 11,5 %	63 306 ± 5,7 %
Simvastatin	S -prøve	167 676 ± 9,6 %	127 527 ± 6,5 %	137 970 ± 10,2 %
	M -prøve	169 863 ± 14,0 %	132 021 ± 12,2 %	146 600 ± 10,4 %
Sulfadoxin	S -prøve	215 994 ± 10,4 %	223 770 ± 10,8 %	213 667 ± 15,9 %
	M -prøve	198 819 ± 10,7 %	206 695 ± 11,2 %	208 547 ± 0,7 %
Sulfametoksazol	S -prøve	49 362 ± 6,1 %	51 667 ± 7,2 %	49 611 ± 11,1 %
	M -prøve	47 970 ± 8,9 %	49 536 ± 10,5 %	50 234 ± 3,4 %
Tetrasyklin	S -prøve	88 074 ± 11,8 %	83 512 ± 19,8 %	80 034 ± 30,2 %
	M -prøve	31 405 ± 58,2 %	23 055 ± 16,4 %	31 445 ± 61,1 %
Trimetoprim	S -prøve	69 920 ± 10,8 %	71 335 ± 12,1 %	68 523 ± 15,1 %
	M -prøve	65 580 ± 16,6 %	67 545 ± 12,7 %	70 564 ± 15,9 %

Tabell A 23 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE-steget. S-prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE.

		25 mg PSA [6]	12,5 mg PSA [5]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	6 673 ± 10,7 %	7 514 ± 39,1 %
	M-prøve	12 091 ± 12,1 %	9 564 ± 11,7 %
Amlodipin	S-prøve	273 062 ± 3,0 %	204 743 ± 44,0 %
	M-prøve	267 039 ± 3,3 %	182 975 ± 49,0 %
Benzylpenicillin	S-prøve	4 626 ± 15,1 %	2 999 ± 39,1 %
	M-prøve	4 015 ± 7,0 %	3 033 ± 58,4 %
Ciprofloksacin	S-prøve	61 735 ± 24,6 %	60 339 ± 30,5 %
	M-prøve	44 679 ± 64,6 %	42 919 ± 65,4 %
Ibuprofen	S-prøve	15 683 ± 3,0 %	11 425 ± 42,7 %
	M-prøve	14 260 ± 9,6 %	9 923 ± 47,5 %
Ketoprofen	S-prøve	75 692 ± 3,9 %	55 281 ± 43,9 %
	M-prøve	67 826 ± 11,2 %	47 372 ± 53,0 %
Koffein	S-prøve	302 153 ± 4,4 %	230 005 ± 37,7 %
	M-prøve	295 023 ± 4,8 %	203 511 ± 40,9 %
Losartan	S-prøve	205 588 ± 3,4 %	149 714 ± 44,3 %
	M-prøve	194 288 ± 4,8 %	130 344 ± 50,6 %
Metronidazol	S-prøve	60 035 ± 15,4 %	43 626 ± 36,9 %
	M-prøve	51 057 ± 7,0 %	34 772 ± 36,4 %
Prednisolon	S-prøve	61 783 ± 2,8 %	45 181 ± 41,3 %
	M-prøve	60 286 ± 2,6 %	40 132 ± 47,3 %
Simvastatin	S-prøve	156 870 ± 2,9 %	110 506 ± 44,2 %
	M-prøve	151 345 ± 2,5 %	99 212 ± 48,3 %
Sulfadoxin	S-prøve	178 296 ± 10,2 %	137 576 ± 47,1 %
	M-prøve	154 485 ± 22,2 %	112 793 ± 57,9 %
Sulfametoksazol	S-prøve	50 649 ± 3,3 %	37 251 ± 45,0 %
	M-prøve	46 259 ± 11,9 %	31 585 ± 53,8 %
Tetrasyklin	S-prøve	76 560 ± 62,3 %	74 652 ± 62,3 %
	M-prøve	46 406 ± 84,2 %	43 379 ± 83,5 %
Trimetoprim	S-prøve	70 041 ± 5,8 %	52 316 ± 32,8 %
	M-prøve	67 006 ± 6,7 %	47 677 ± 40,5 %

Tabell A 24 Gjennomsnittlig areal for 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved 37,5 mg PSA til dSPE-steget, samt ved n-heksanopprensning istedenfor dSPE. S-prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE. For n-heksanprøvene er S-prøvene delprøver uten, og M-prøver med 1 % V/V tilsatt av 5 % V/V maursyre i ACN.

		37,5 mg PSA [6]	n-heksan [6]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	3 368 ± 9,7 %	160 917 ± 45,6 %
	M-prøve	9 824 ± 9,7 %	177 619 ± 23,0 %
Amlodipin	S-prøve	117 324 ± 7,3 %	95 708 ± 16,7 %
	M-prøve	115 283 ± 5,5 %	93 393 ± 14,0 %
Benzylpenicillin	S-prøve	2 838 ± 10,2 %	2 416 ± 18,1 %
	M-prøve	2 770 ± 9,8 %	2 180 ± 19,7 %
Ciprofloksacin	S-prøve	67 632 ± 6,9 %	34 356 ± 35,9 %
	M-prøve	61 947 ± 2,3 %	30 671 ± 6,9 %
Ibuprofen	S-prøve	15 649 ± 4,1 %	12 731 ± 19,6 %
	M-prøve	15 620 ± 4,1 %	12 188 ± 18,7 %
Ketoprofen	S-prøve	72 006 ± 3,7 %	58 845 ± 17,8 %
	M-prøve	70 265 ± 3,1 %	57 120 ± 14,8 %
Koffein	S-prøve	117 938 ± 9,5 %	85 042 ± 29,1 %
	M-prøve	121 246 ± 7,7 %	76 658 ± 13,2 %
Losartan	S-prøve	168 765 ± 5,6 %	136 250 ± 18,8 %
	M-prøve	164 495 ± 3,9 %	131 189 ± 14,0 %
Metronidazol	S-prøve	52 806 ± 17,1 %	28 009 ± 37,2 %
	M-prøve	41 992 ± 10,9 %	24 411 ± 13,8 %
Prednisolon	S-prøve	54 835 ± 5,1 %	40 943 ± 21,8 %
	M-prøve	55 620 ± 4,3 %	38 821 ± 12,7 %
Simvastatin	S-prøve	125 123 ± 14,9 %	106 409 ± 15,3 %
	M-prøve	126 656 ± 11,4 %	104 762 ± 19,5 %
Sulfadoxin	S-prøve	132 046 ± 7,8 %	86 765 ± 28,2 %
	M-prøve	125 727 ± 4,4 %	79 112 ± 17,5 %
Sulfametoksazol	S-prøve	50 697 ± 5,4 %	38 424 ± 22,6 %
	M-prøve	50 961 ± 3,9 %	36 642 ± 15,7 %
Tetrasyklin	S-prøve	60 349 ± 15,3 %	13 760 ± 76,7 %
	M-prøve	35 785 ± 6,6 %	9 203 ± 42,6 %
Trimetoprim	S-prøve	58 658 ± 4,8 %	35 873 ± 32,8 %
	M-prøve	56 697 ± 7,1	34 459 ± 7,5 %

Tabell A 25 Gjennomsnittlig areal til 14 av de 15 legemidlene samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE-steget. S-prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE.

		50 mg PSA [6]	75 mg PSA [6]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	4 220 ± 8,2 %	4 153 ± 8,6 %
	M-prøve	14 322 ± 5,6 %	17 755 ± 9,8 %
Amlodipin	S-prøve	124 565 ± 8,1 %	140 872 ± 6,1 %
	M-prøve	122 773 ± 4,1 %	126 682 ± 8,1 %
Benzylpenicillin	S-prøve	8 644 ± 13,0 % *	9 013 ± 6,3 %
	M-prøve	7 473 ± 3,6 %	6 196 ± 9,8 %
Ciprofloksacin	S-prøve	71 291 ± 8,1 %	75 839 ± 3,8 %
	M-prøve	63 716 ± 3,2 %	54 332 ± 6,5 %
Ibuprofen	S-prøve	19 494 ± 5,5 %	20 634 ± 2,4 %
	M-prøve	19 663 ± 2,7 %	19 031 ± 6,4 %
Ketoprofen	S-prøve	86 180 ± 7,2 %	93 970 ± 3,1 %
	M-prøve	83 681 ± 2,2 %	75 395 ± 7,4 %
Koffein	S-prøve	132 902 ± 8,5 %	144 421 ± 6,2 %
	M-prøve	139 643 ± 3,5 %	144 705 ± 3,8 %
Losartan	S-prøve	209 225 ± 3,5 %	229 562 ± 4,7 %
	M-prøve	208 220 ± 2,7 %	201 562 ± 6,5 %
Metronidazol	S-prøve	56 784 ± 2,7 %	66 856 ± 16,8 %
	M-prøve	48 678 ± 6,8 %	49 431 ± 5,0 %
Prednisolon	S-prøve	70 035 ± 7,6 %	76 970 ± 4,5 %
	M-prøve	72 938 ± 3,6 %	75 183 ± 5,4 %
Simvastatin	S-prøve	196 198 ± 7,7 %	194 246 ± 15,9 %
	M-prøve	205 761 ± 5,0 %	196 828 ± 18,1 %
Sulfadoxin	S-prøve	202 600 ± 7,7 %	224 382 ± 5,1 %
	M-prøve	194 098 ± 2,2 %	191 186 ± 4,3 %
Sulfametoksazol	S-prøve	72 915 ± 7,8 %	79 999 ± 5,1 %
	M-prøve	74 588 ± 2,0 %	77 189 ± 4,3 %
Tetrasyklin	S-prøve	76 503 ± 9,9 %	82 671 ± 9,0 %
	M-prøve	39 087 ± 9,7 %	26 728 ± 14,6 %
Trimetoprim	S-prøve	61 994 ± 8,6 %	69 221 ± 6,6 %
	M-prøve	64 547 ± 5,5 %	64 350 ± 3,7 %

* En av S-prøvene til Benzylpenicillin var en tydelig uteligger, og er derfor kuttet ut videre. Se Tabell A 26.

Tabell A 26 Areal for benzylpenicillin ved 50 mg og 75 mg PSA benyttet til dSPE-steget. S-prøve er delprøve som ikke har gått gjennom dSPE. M-prøve er delprøve gått gjennom dSPE.

Benzylpenicillin	
	8 028
	9 581
	9 530
S-prøve	515*
	9 100
	6 982
50 mg PSA	7 814
	7 702
	7 181
M-prøve	7 253
	7 289
	7 600
	9 069
	9 343
	9 126
S-prøve	9 241
	7 880
	9 417
	6 292
75 mg PSA	5 587
	5 683
M-prøve	7 287
	6 202
	6 123

* Dette er en tydelig uteligger, og den velges dermed vekk videre

Tabell A 27 Gjennomsnittlig areal til 14 av de 15 legemidlene, samt sulfadoxin, ved varierende mengde PSA til dSPE. S prøvene er prøvene før de gjennomgår dSPE. M-prøvene er etter gjennomført dSPE.

		12,5 mg [3]	25 mg [3]	37,5 mg [3]	50 mg [3]
Acetylsalisylsyre	S-prøve	5 517 ± 12,0 %	5 520 ± 5,5 %	5 747 ± 11,4 %	5 660 ± 6,3 %
	M-prøve	8 754 ± 5,6 %	11 419 ± 7,7 %	14 452 ± 12,5 %	16 010 ± 10,8 %
Amlodipin	S-prøve	142 564 ± 3,3 %	139 686 ± 1,5 %	142 565 ± 2,9 %	145 622 ± 1,2 %
	M-prøve	133 728 ± 3,2 %	138 014 ± 1,7 %	128 811 ± 3,1 %	140 087 ± 3,7 %
Benzylpenicillin	S-prøve	6 784 ± 2,9 %	6 841 ± 1,6 %	6 396 ± 9,2 %	6 707 ± 2,8 %
	M-prøve	6 592 ± 7,0 %	6 754 ± 1,8 %	5 718 ± 7,2 %	5 634 ± 1,8 %
Ciprofloksacin	S-prøve	146 432 ± 4,8 %	141 126 ± 2,8 %	137 984 ± 2,2 %	140 770 ± 2,4 %
	M-prøve	135 930 ± 3,5 %	133 639 ± 3,1 %	111 414 ± 8,6 %	114 321 ± 5,9 %
Ibuprofen	S-prøve	17 764 ± 3,2 %	17 604 ± 3,7 %	17 664 ± 6,1 %	17 976 ± 1,8 %
	M-prøve	17 041 ± 1,0 %	17 378 ± 0,3 %	16 863 ± 1,5 %	16 487 ± 4,7 %
Ketoprofen	S-prøve	154 942 ± 4,0 %	152 382 ± 2,2 %	151 848 ± 2,8 %	155 656 ± 0,9 %
	M-prøve	150 576 ± 0,8 %	151 097 ± 0,2 %	136 917 ± 4,0 %	137 228 ± 6,1 %
Koffein	S-prøve	132 432 ± 4,9 %	128 701 ± 6,2 %	131 015 ± 7,4 %	127 269 ± 6,3 %
	M-prøve	126 032 ± 5,0 %	128 610 ± 4,9 %	124 929 ± 2,2 %	129 861 ± 0,8 %
Losartan	S-prøve	413 123 ± 0,4 %	406 668 ± 2,9 %	413 428 ± 1,1 %	420 835 ± 2,5 %
	M-prøve	394 585 ± 2,2 %	402 364 ± 1,3 %	370 732 ± 3,8 %	388 264 ± 2,7 %
Metronidazol	S-prøve	133 891 ± 6,6 %	130 336 ± 4,2 %	129 118 ± 3,9 %	130 847 ± 5,7 %
	M-prøve	107 180 ± 4,3 %	104 227 ± 3,4 %	96 867 ± 5,4 %	102 872 ± 2,4 %
Prednisolon	S-prøve	152 770 ± 5,4 %	151 188 ± 2,3 %	153 578 ± 2,0 %	154 766 ± 1,1 %
	M-prøve	149 666 ± 2,9 %	153 290 ± 2,6 %	146 944 ± 3,2 %	154 678 ± 2,7 %
Simvastatin	S-prøve	168 617 ± 3,6 %	169 429 ± 4,0 %	174 946 ± 3,5 %	180 104 ± 2,0 %
	M-prøve	165 984 ± 4,0 %	172 531 ± 1,5 %	168 023 ± 2,3 %	182 854 ± 2,7 %
Sulfadoxin	S-prøve	242 943 ± 5,8 %	235 103 ± 1,9 %	236 992 ± 2,0 %	238 456 ± 0,9 %
	M-prøve	229 017 ± 1,3 %	230 952 ± 1,5 %	211 600 ± 2,0 %	211 827 ± 5,5 %
Sulfametoksazol	S-prøve	118 114 ± 3,7 %	114 624 ± 2,6 %	114 831 ± 1,9 %	117 476 ± 1,9 %
	M-prøve	112 964 ± 2,2 %	116 615 ± 2,2 %	112 360 ± 2,1 %	114 976 ± 5,9 %
Tetrasyklin	S-prøve	71 723 ± 5,0 %	69 000 ± 11,5 %	66 781 ± 18,8 %	59 537 ± 14,7 %
	M-prøve	30 092 ± 35,0 %	23 272 ± 27,8 %	16 370 ± 37,4 %	20 305 ± 13,5 %
Trimetoprim	S-prøve	132 007 ± 2,3 %	130 398 ± 6,0 %	131 635 ± 10,2 %	122 308 ± 9,7 %
	M-prøve	117 365 ± 13,0 %	120 219 ± 8,3 %	118 555 ± 5,3 %	121 524 ± 2,4 %

Tabell A 28 Prosentvis gjenfinning for 14 av de 15 legemidlene ved neddamping av standardløsninger i vann. S-prøve er delprøver tatt før dSPE-steget under QuEChERS ekstraksjonen, og M-prøver er delprøver tatt ut etter dSPE-steget.

		Neddampet		S-prøve		M-prøve	
		Med	Uten	Med	Uten	Med	Uten
		DMSO[3]	DMSO[3]	DMSO[3]	DMSO[3]	DMSO[3]	DMSO[3]
Amlodipin	Nitrogen	87	76	107	83	118	93
	Trykkluft	97	115	114	92	96	75
Benzylpenicillin	Nitrogen	4 841	4 781	4 756	4 181	2 718	2 571
	Trykkluft	139	107	128	135	108	127
Ciprofloksacin	Nitrogen	68	71	78	81	85	99
	Trykkluft	95	82	101	104	87	102
Ibuprofen	Nitrogen	126	123	106	105	105	96
	Trykkluft	109	245	114	49	114	53
Ketoprofen	Nitrogen	121	125	141	140	128	116
	Trykkluft	152	141	138	137	131	129
Koffein	Nitrogen	89	93	100	98	90	90
	Trykkluft	97	97	94	94	89	85
Losartan	Nitrogen	114	115	112	99	127	121
	Trykkluft	118	107	127	123	109	104
Metoprolol	Nitrogen	85	86	111	98	114	102
	Trykkluft	93	100	118	104	100	85
Metronidazol	Nitrogen	117	138	133	117	159	141
	Trykkluft	114	128	140	110	116	83
Prednisolon	Nitrogen	129	146	135	128	147	138
	Trykkluft	128	106	100	109	131	144
Sulfadoxin	Nitrogen	112	117	124	121	108	102
	Trykkluft	110	100	114	112	115	113
Sulfametoksazol	Nitrogen	124	125	127	123	114	105
	Trykkluft	110	116	125	107	111	97
Simvastatin	Nitrogen	139	135	158	138	139	124
	Trykkluft	140	138	156	126	123	104
Tetrasyklin	Nitrogen	84	80	89	84	85	85
	Trykkluft	1 352	1 588	1 511	1 255	1 485	1 323
Trimetoprim	Nitrogen	110	115	124	114	118	106
	Trykkluft	93	113	141	102	129	106

Tabell A 29 Rådata for metodedetest hvor ubufret metode, EN-metoden og EN-metoden tilsatt 0,1 g/mL Na₂EDTA, er testet mot hverandre med utløpsvann fra VEAS. Na₂SO₄ er brukt som tørkesalt.

		Acetylsalisylsyre	Amlodipin	Benzylpenicillin	Ciprofloksacin
Spiket 1, ubufret	S-prøve	45 047	51 903	110 592	20 028
	M-prøve	64 755	52 276	102 513	15 220
Spiket 1, EN-metoden	S-prøve	54 178	52 039	55 370	22 155
	M-prøve	58 517	47 207	88 174	17 635
Spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	57 961	48 108	97 813	20 076
	M-prøve	75 106	48 762	83 974	15 199
Spiket 2, ubufret	S-prøve	22 110	47 885	101 706	10 069
	M-prøve	29 214	47 456	100 075	8 937
Spiket 2, EN-metoden	S-prøve	72 498	56 325	98 622	11 467
	M-prøve	82 827	57 859	93 943	8 936
Spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	27 719	45 399	88 624	10 322
	M-prøve	34 348	46 189	83 427	8 108
Spiket 3, ubufret	S-prøve	51 479	89 539	130 486	14 119
	M-prøve	67 911	87 025	120 190	11 858
Spiket 3, EN-metoden	S-prøve	66 179	90 952	118 754	16 180
	M-prøve	80 539	89 928	109 835	11 284
Spiket 3, Na ₂ EDTA	S-prøve	59 342	80 172	107 242	14 274
	M-prøve	66 682	77 767	98 595	10 159
Spiket ISTD, ubufret	S-prøve	74 218	338	-	791
	M-prøve	93 334	288	-	668
Spiket ISTD, EN-metoden	S-prøve	78 502	295	-	499
	M-prøve	68 887	285	-	767
Spiket ISTD, Na ₂ EDTA	S-prøve	84 698	342	-	837
	M-prøve	82 497	312	-	947
Ikke-spiket 1, ubufret	S-prøve	24 554	157	-	1 067
	M-prøve	19 545*	48 107*	104 052*	10 054*
Ikke-spiket 1, EN-metoden	S-prøve	37 251	137	-	910
	M-prøve	43 753	153	-	646
Ikke-spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	28 299	168	-	674
	M-prøve	33 661	173	-	563
Ikke-spiket 2, ubufret	S-prøve	29 192	269	-	789
	M-prøve	34 686	255	-	1 150
Ikke-spiket 2, EN-metoden	S-prøve	38 991	257	-	1 476
	M-prøve	44 881	302	-	1 483
Ikke-spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	39 715	280	-	825
	M-prøve	41 025	238	-	706

* Prøven er en tydelig uteligger, hvor det høye areal indikerer at en annen prøve enn ikke-spiket 1, ubufret M-prøve er målt. Prøven er derfor valgt vekk.

		Ibuprofen	Ketoprofen	Koffein	Losartan	Metoprolol	Metronidazol
Spiket 1,	S-prøve	10 703	46 253	73 548	173 889	106 625	41 886
ubufret	M-prøve	10 101	43 254	71 963	165 767	102 265	39 098
Spiket 1,	S-prøve	10 582	45 080	77 310	170 490	108 710	43 697
EN-metoden	M-prøve	10 450	41 378	73 279	159 137	100 892	38 662
Spiket 1,	S-prøve	10 284	45 092	76 744	166 030	106 209	42 803
Na ₂ EDTA	M-prøve	9 478	37 459	77 946	152 323	100 530	40 638
Spiket 2,	S-prøve	13 735	60 636	81 244	198 174	129 291	63 031
ubufret	M-prøve	12 850	59 982	80 742	195 715	134 381	61 381
Spiket 2,	S-prøve	13 472	57 292	73 501	192 112	133 370	56 283
EN-metoden	M-prøve	13 628	55 684	70 748	182 385	132 581	55 060
Spiket 2,	S-prøve	14 168	58 222	87 253	187 299	137 272	63 167
Na ₂ EDTA	M-prøve	13 784	53 902	82 388	179 472	133 402	63 590
Spiket 3,	S-prøve	15 427	54 748	81 653	212 747	127 911	45 887
ubufret	M-prøve	13 850	51 629	81 399	204 541	126 235	45 578
Spiket 3,	S-prøve	14 806	54 709	87 454	215 699	136 163	51 547
EN-metoden	M-prøve	15 012	49 920	84 249	201 999	128 704	46 883
Spiket 3,	S-prøve	14 419	48 341	81 683	187 785	124 332	45 138
Na ₂ EDTA	M-prøve	13 806	44 282	80 163	179 704	117 036	43 498
Spiket	S-prøve	5 121	2 766	4 118	35 653	28 916	1 385
ISTD,							
ubufret	M-prøve	5 525	2 687	4 280	33 933	30 619	1 468
Spiket	S-prøve	5 234	2 608	4 381	32 394	31 513	1 495
ISTD,							
EN-metoden	M-prøve	5 308	2 446	4 771	31 917	30 175	1 230
Spiket	S-prøve	5 278	2 643	5 363	33 207	30 978	1 421
ISTD,							
Na ₂ EDTA	M-prøve	5 542	2 531	4 686	30 766	31 096	1 209
Ikke-spiket	S-prøve	7 051	3 278	6 619	38 073	32 318	1 665
1,							
Ubufret	M-prøve	15 194*	63 073*	83 340*	202 602*	131 976*	62 636*
Ikke-spiket	S-prøve	7 021	3 051	6 252	36 785	34 183	1 652
1,							
EN-metoden	M-prøve	7 026	3 203	6 678	34 256	33 048	1 600
Ikke-spiket	S-prøve	6 673	3 401	6 561	36 223	35 143	1 749
1,	M-prøve	7 675	2 879	6 891	33 236	31 592	1 795
Ikke-spiket	S-prøve	6 846	6 141	4 132	39 597	36 259	1 661
2,							
ubufret	M-prøve	6 424	5 664	4 078	38 250	35 277	1 310
Ikke-spiket	S-prøve	6 593	5 687	4 127	37 050	35 934	1 786
2,							
EN-metoden	M-prøve	6 753	5 430	4 184	35 722	34 992	1 475
Ikke-spiket	S-prøve	6 974	5 955	3 004	36 993	38 397	1 244
2,							
Na ₂ EDTA	M-prøve	6 802	5 332	4 465	35 970	33 549	1 165

* Prøven er en tydelig uteligger, hvor det høye areal indikerer at en annen prøve enn ikke-spiket 1, ubufret M-prøve er målt. Prøven er derfor valgt vekk.

		Prednisolon	Simvastatin	Sulfadoxin	Sulfadoxin-D₃	Sulfametoksazol
Spiket 1, ubufret	S-prøve	26 690	37 111	107 735	95 157	30 588
	M-prøve	26 519	34 880	103 821	89 215	28 668
Spiket 1, EN-metoden	S-prøve	27 711	34 785	116 656	103 929	31 385
	M-prøve	26 765	32 867	100 330	85 423	27 917
Spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	26 982	33 294	109 680	96 820	29 854
	M-prøve	28 182	32 791	93 993	81 898	25 295
Spiket 2, ubufret	S-prøve	34 805	88 687	115 405	84 918	38 264
	M-prøve	34 520	89 067	115 726	85 680	36 682
Spiket 2, EN-metoden	S-prøve	36 743	89 200	113 312	86 172	35 977
	M-prøve	35 020	84 806	103 959	77 651	34 714
Spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	36 862	84 837	122 936	90 354	37 366
	M-prøve	33 888	82 471	107 137	77 182	34 607
Spiket 3, ubufret	S-prøve	31 715	76 049	166 132	126 132	41 215
	M-prøve	31 658	74 078	152 461	115 176	40 367
Spiket 3, EN-metoden	S-prøve	33 948	74 888	164 777	126 082	42 211
	M-prøve	32 793	72 102	148 552	113 765	38 619
Spiket 3, Na ₂ EDTA	S-prøve	31 395	69 871	159 820	122 379	38 637
	M-prøve	30 499	66 201	136 844	104 695	35 066
Spiket ISTD, ubufret	S-prøve	-	-	254	108 266	4 167
	M-prøve	-	-	249	105 951	3 824
Spiket ISTD, EN-metoden	S-prøve	-	-	455	117 088	4 449
	M-prøve	-	-	384	98 810	3 705
Spiket ISTD, Na ₂ EDTA	S-prøve	-	-	647	109 960	4 082
	M-prøve	-	-	405	97 337	3 738
Ikke-spiket 1, ubufret	S-prøve	-	-	133	-	4 733
	M-prøve	-	87 041*	115 363	86 066	38 176
Ikke-spiket 1, EN-metoden	S-prøve	-	-	354	-	4 549
	M-prøve	-	-	385	-	4 282
Ikke-spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	-	-	218	-	4 570
	M-prøve	-	-	132	-	4 437
Ikke-spiket 2, ubufret	S-prøve	2 087	-	4 038	-	4 744
	M-prøve	3 898	-	4 028	-	4 346
Ikke-spiket 2, EN-metoden	S-prøve	1 738	-	4 918	-	4 588
	M-prøve	789	-	3 953	-	4 314
Ikke-spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	2 535	-	4 293	-	4 669
	M-prøve	1 277	-	4 604	-	4 217

* Prøven er en tydelig uteligger, hvor det høye areal indikerer at en annen prøve enn ikke-spiket 1, ubufret M-prøve er målt. Prøven er derfor valgt vekk.

		Tetrasyklin	Trimetoprim	Ibuprofen-D₃
Spiket 1, ubufret	S-prøve	6 599	58 185	1 253
	M-prøve	4 789	81 454	2 554
Spiket 1, EN-metoden	S-prøve	3 926	62 806	2 828
	M-prøve	2 757	59 953	2 390
Spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	4 188	60 066	2 993
	M-prøve	2 474	62 777	2 252
Spiket 2, ubufret	S-prøve	2 589	58 267	3 731
	M-prøve	2 105	54 423	3 936
Spiket 2, EN-metoden	S-prøve	1 910	59 289	3 006
	M-prøve	1 233	55 863	3 645
Spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	1 736	61 578	3 227
	M-prøve	1 092	57 060	3 382
Spiket 3, ubufret	S-prøve	1 797	62 593	4 511
	M-prøve	1 352	56 354	4 075
Spiket 3, EN-metoden	S-prøve	2 211	68 125	4 314
	M-prøve	1 427	62 200	4 068
Spiket 3, Na ₂ EDTA	S-prøve	2 020	60 166	3 667
	M-prøve	1 302	70 939	3 552
Spiket ISTD, ubufret	S-prøve	181	8 638	2 994
	M-prøve	372	11 338	1 820
Spiket ISTD, EN-metoden	S-prøve	240	9 439	3 288
	M-prøve	242	9 239	1 369
Spiket ISTD, Na ₂ EDTA	S-prøve	253	10 350	1 521
	M-prøve	132	10 229	3 184
Ikke-spiket 1, ubufret	S-prøve	118	9 722	-
	M-prøve	2 453*	59 839*	4 045*
Ikke-spiket 1, EN-metoden	S-prøve	193	9 338	-
	M-prøve	129	9 711	-
Ikke-spiket 1, Na ₂ EDTA	S-prøve	208	9 626	-
	M-prøve	194	7 112	-
Ikke-spiket 2, ubufret	S-prøve	200	9 124	-
	M-prøve	83	12 800	-
Ikke-spiket 2, EN-metoden	S-prøve	219	10 511	-
	M-prøve	154	10 122	-
Ikke-spiket 2, Na ₂ EDTA	S-prøve	225	10 166	-
	M-prøve	152	9 710	-

* Prøven er en tydelig uteligger, hvor det høye areal indikerer at en annen prøve enn ikke-spiket 1, ubufret M-prøve er målt. Prøven er derfor valgt vekk.

Metodevalidering

Tabell A 30 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for acetylsalisylsyre sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid, Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Blindsignal er ikke subtrahert fra arealene til de resterende prøvene. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 179 → 135				Konfirmering 179 → 79.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0	27 828	103 905	0,268	0,173	5 839	103 905	0,056	0,173
25	25 858	63 407	0,408	0,168	4 740	63 407	0,075	0,173
50	27 495	46 925	0,586	0,173	5 685	46 925	0,121	0,168
100	25 198	59 337	0,425	0,173	5 025	59 337	0,085	0,168
300	21 429	60 505	0,354	0,173	3 857	60 505	0,064	0,168
600	26 166	76 130	0,344	0,168	5 522	76 130	0,073	0,173
600	29 311	31 661	0,926	0,173	6 730	31 661	0,213	0,173
600	29 256	59 068	0,495	0,173	5 593	59 068	0,095	0,168
600	24 730	28 998	0,853	0,173	5 055	28 998	0,174	0,168
600	30 391	13 767	2,208	0,173	6 060	13 767	0,440	0,168
600	30 881	53 553	0,577	0,173	5 258	53 553	0,098	0,173
1200	24 447	60 282	0,406	0,168	4 503	60 282	0,075	0,168
Gjennomsnitt	28 456	43 863	0,900	0,172	5 703	43 863	0,182	0,170
Standardavvik	2 454	22 986	0,677	0,002	607	22 986	0,137	0,002
RSD	0,086	0,524	0,752	0,014	0,107	0,524	0,754	0,014
RSD %	8,6	52,4	75,2	1,4	10,7	52,4	75,4	1,4

Tabell A 31 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for acetylsalisylsyre sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid, Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Blindsignal er ikke subtrahert fra arealene til de resterende prøvene. Gjennomsnittet er beregnet fra kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 179 → 135				Konfirmering 179 → 79.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0	36 514	103 006	0,354	0,116	7 386	103 006	0,072	0,116
25	37 445	65 515	0,572	0,112	8 110	65 515	0,124	0,112
50	40 318	47 825	0,843	0,112	8 317	47 825	0,174	0,112
100	36 939	60 633	0,609	0,112	8 255	60 633	0,136	0,112
300	35 836	59 786	0,599	0,112	8 574	59 786	0,143	0,112
600	38 193	71 057	0,537	0,112	9 025	71 057	0,127	0,112
600	41 303	49 238	0,839	0,112	7 936	49 238	0,161	0,112
600	33 816	29 903	1,131	0,112	6 857	29 903	0,229	0,112
600	41 558	30 707	1,353	0,112	8 823	30 707	0,287	0,112
600	40 566	13 493	3,006	0,112	8 714	13 493	0,646	0,112
600	39 087	55 219	0,708	0,112	8 535	55 219	0,155	0,112
1200	34 109	58 605	0,582	0,112	7 439	58 605	0,127	0,112
Gjennomsnitt	39 087	41 603	1,262	0,113	8 315	41 603	0,268	0,113
Standardavvik	2 891	20 770	0,903	0,001	805	20 770	0,194	0,001
RSD	0,074	0,499	0,715	0,008	0,097	0,499	0,726	0,008
RSD %	7,4	49,9	71,5	0,8	9,7	49,9	72,6	0,8

Tabell A 32 Areal for acetylsalisylsyre sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering 179 → 135	Konfirmering 179 → 79.1
100	27 983	5 032
100	27 662	3 068
100	30 688	4 096
100	24 962	4 687
100	32 861	5 502
100	24 982	2 987

Tabell A 33 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for amlodipin sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid, Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 409.2 → 238.1				Konfirmering 409.2 → 294.1				Konfirmering 409.2 → 377.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905				103 905		
25	5 090	63 407	0,080	1,158	3 685	63 407	0,058	1,158		63 407		
50	10 052	46 925	0,214	1,158	7 998	46 925	0,170	1,158	1 117	46 925	0,024	1,158
100	25 042	59 337	0,422	1,158	16 762	59 337	0,282	1,158	2 529	59 337	0,043	1,158
300	50 107	60 505	0,828	1,152	36 384	60 505	0,601	1,152	4 888	60 505	0,081	1,152
600	144 403	76 130	1,897	1,152	111 701	76 130	1,467	1,152	14 203	76 130	0,187	1,152
600	134 077	31 661	4,235	1,152	105 855	31 661	3,343	1,152	5 573	31 661	0,176	1,147
600	151 845	59 068	2,571	1,158	120 799	59 068	2,045	1,158	14 394	59 068	0,244	1,158
600	146 293	28 998	5,045	1,158	119 872	28 998	4,134	1,158	10 873	28 998	0,375	1,158
600	149 089	13 767	10,829	1,152	101 613	13 767	7,381	1,152	13 480	13 767	0,989	1,152
600	310 752*	53 553	5,803*	1,152*	207 814*	53 553	3,881*	1,152*	24 353*	53 553	0,455*	1,152*
1200	255 121	60 282	4,232	1,152	183 058	60 282	3,037	1,152	23 600	60 282	0,391	1,152
Gjennomsnitt	145 142	43 863	4,915	1,155	111 968	43 863	3,674	1,155	11 705	43 863	0,392	1,154
Standardavvik	6 797	22 986	3,538	0,003	8 443	22 986	2,323	0,003	3 705	22 986	0,338	0,004
RSD	0,047	0,524	0,720	0,003	0,075	0,524	0,632	0,003	0,317	0,524	0,861	0,003
RSD %	4,7	52,4	72,0	0,3	7,5	52,4	63,2	0,3	31,7	52,4	86,1	0,3

*Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre, samt valgt vekk i beregning av standardavvik.

Tabell A 34 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for amlodipin sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 409.2 → 238.1				Konfirmering 409.2 → 294.1				Konfirmering 409.2 → 377.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		
25	5 708	65 515	0,087	1,152	4 137	65 515	0,063	1,152		65 515		
50	9 969	47 825	0,208	1,152	7 701	47 825	0,161	1,152	885	47 825	0,019	1,152
100	26 196	60 633	0,432	1,152	17 317	60 633	0,286	1,152	2 046	60 633	0,034	1,152
300	50 511	59 786	0,845	1,152	36 256	59 786	0,606	1,152	4 096	59 786	0,069	1,152
600	142 722	71 057	2,009	1,152	116 164	71 057	1,635	1,152	11 821	71 057	0,166	1,152
600	294 857*	49 238	5,988*	1,157	235 347*	49 238	4,780*	1,157	23 261*	49 238	0,472*	1,157
600	75 279	29 903	2,517	1,147	59 123	29 903	1,977	1,147	6 497	55 219	0,217	1,147
600	129 902	30 707	4,230	1,152	106 555	30 707	3,470	1,152	4 909	61 581	0,160	1,147
600	136 601	13 493	10,124	1,152	111 804	13 493	8,286	1,152	12 767	66 718	0,946	1,152
600	75 101	55 219	1,360	1,147	47 708	55 219	0,864	1,147	5 521	62 564	0,100	1,147
1200	255 328	58 605	4,357	1,152	175 759	58 605	2,999	1,152	19 998	58 605	0,341	1,152
Gjennomsnitt	111 921	41 603	4,048	1,152	88 271	41 603	3,246	1,152	8 303	61 063	0,318	1,151
Standardavvik	33 836	20 770	3,559	0,003	32 253	20 770	2,972	0,003	3 702	7 853	0,354	0,003
RSD	0,302	0,499	0,879	0,002	0,365	0,499	0,915	0,002	0,446	0,141	1,112	0,003
RSD %	30,2	49,9	87,9	0,2	36,5	49,9	91,5	0,2	44,6	14,1	111,2	0,3

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 35 Verdier for linearitetsrekken til amlodipin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	409.2 → 238.1		409.2 → 294.1		409.2 → 377.1	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	216	216	157	152	20	17
Standardavvik stigningstall	10,6	10,0	10,4	13,3	1,5	1,2
Skjæringspunkt	-439	-63	377	1 901	-14	141
Standardavvik skjæringspunkt	5 943	5 611	5 855	7 485	285	740
R ²	0,991	0,992	0,983	0,970	0,983	0,985
Standardavvik y	10 765	10 162	10 605	13 574	1 436	1 132
F-verdi	421	469	228	131	172	200
Frihetsgrader	4	4	4	4	3	3
ss reg	4,88*10 ¹⁰	4,84*10 ¹⁰	2,57*10 ¹⁰	2,41*10 ¹⁰	3,55*10 ⁸	2,56*10 ⁸
ss res	4,64*10 ⁸	4,13*10 ⁸	4,50*10 ⁸	7,37*10 ⁸	6,19*10 ⁶	3,84*10 ⁶
Avvik på måleområdet	0,0488	0,0462	0,0662	0,0875	0,0762	0,0708
Nedre 95 % skjæringspunkt	-16 940	-15 641	-15 879	-18 907	-2 703	-2 215
Øvre 95 % skjæringspunkt	16 063	15 514	16 635	22 709	3 272	2 496

Tabell A 36 Areal for amlodipin sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering	Konfirmering	Konfirmering
	409.2 → 238.1	409.2 → 294.1	409.2 → 377.1
100	16 983*	10 992*	-*
100	24 098	16 778	2 105
100	21 485	14 682	1 882
100	19 628	13 001	1 362
100	34 666*	23 067*	4 012*
100	27 982	18 776	3 002

* Prøvene er tydelige avvik, og er derfor valgt vekk videre

Tabell A 37 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til amlodipin ved 600 ng/mL.

	409.2 → 238.1		409.2 → 294.1		409.2 → 377.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind			531			
Ren standard	432 185		299 941		40 712	
Spiket ekstrakt	236 339		193 992		22 368	
600	144 403	33,4	111 701	37,2	14 203	34,9
600	134 077	31,0	105 855	35,3	5 573	13,7
600	151 845	35,1	120 799	40,3	14 394	35,4
600	146 293	33,8	119 872	40,0	10 873	26,7
600	149 089	34,5	101 613	33,9	13 480	33,1
	R^T gjennomsnitt	33,6	Gjennomsnitt	37,3	Gjennomsnitt	28,8
	Standardavvik	1,6	Standardavvik	2,8	Standardavvik	9,1
	RSD %	4,7	RSD %	7,5	RSD %	31,7
	Max	35,1	Max	40,3	Max	35,4
	Min	31,0	Min	33,9	Min	13,7
Gjennomsnitt spike 600	145 142		111 968		11 705	
R^{MS}, matrikseffekt	0,547	54,7	0,647	64,7	0,549	54,9
R^{PO}, i						
prøveopparbeidelsen	0,614	61,4	0,577	57,7	0,523	52,3

Tabell A 38 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til amlodipin ved 600 ng/mL.

	409.2 → 238.1		409.2 → 294.1		409.2 → 377.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	413 944		288 137		36 235	
Spiket ekstrakt	99 278		78 763		7 839	
600	142 722	34,5	116 164	40,3	11 821	32,6
600	75 279	18,2	59 123	20,5	6 497	17,9
600	129 902	31,4	106 555	37,0	4 909	13,5
600	136 601	33,0	111 804	38,8	12 767	35,2
600	75 101	18,1	47 708	16,6	5 521	15,2
	R^T gjennomsnitt	27,0	Gjennomsnitt	30,6	Gjennomsnitt	22,9
	Standardavvik	8,2	Standardavvik	11,2	Standardavvik	10,2
	RSD %	30,2	RSD %	36,5	RSD %	44,6
	Max	34,5	Max	40,3	Max	35,2
	Min	18,1	Min	16,6	Min	13,5
Gjennomsnitt spike 600	111 921		88 271		8 303	
R^{MS} , matrikseffekt	0,240	24,0	0,273	27,3	0,216	21,6
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	1,127	112,7	1,121	112,1	1,059	105,9

Tabell A 39 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for benzylpenicillin sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvantifisering 335 → 217				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905		
25		63 407		
50	1 399	46 925	0,030	1,158
100	4 147	59 337	0,070	1,158
300	4 769	60 505	0,079	1,158
600	8 993	76 130	0,118	1,158
600	17 545	31 661	0,554	1,153
600	16 399	59 068	0,278	1,153
600	20 269	28 998	0,699	1,158
600	11 891	13 767	0,864	1,158
600	22 023*	53 553	0,411*	1,153
1200	31 095	60 282	0,516	1,153
Gjennomsnitt	15 019	43 863	0,503	1,156
Standardavvik	4 526	22 986	0,304	0,003
RSD	0,301	0,524	0,605	0,002
RSD %	30,1	52,4	60,5	0,2

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 40 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for benzylpenicillin sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvantifisering 335 → 217				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006		
25		65 515		
50	1 763	47 825	0,037	1,153
100	2 258	60 633	0,037	1,158
300	4 457	59 786	0,075	1,158
600	8 326	71 057	0,117	1,158
600	35 947*	49 238	0,730*	1,153
600	21 489	29 903	0,719	1,153
600	16 930	30 707	0,551	1,153
600	20 308	13 493	1,505	1,153
600	26 110	55 219	0,473	1,153
1200	16 572	58 605	0,283	1,158
Gjennomsnitt	18 633	41 603	0,673	1,155
Standardavvik	6 633	20 770	0,514	0,003
RSD	0,356	0,499	0,764	0,002
RSD %	35,6	49,9	76,4	0,2

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 41 Verdier for linearitetsrekken til benzylpenicillin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	335 → 217	
	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	24,7	12,9
Standardavvik stigningstall	3,9	0,32
Skjæringspunkt	-1 014	854
Standardavvik skjæringspunkt	2 403	200
R ²	0,930	0,998
Standardavvik y	3 675	305
F-verdi	40	1 597
Frihetsgrader	3	3
ss reg	5,41*10 ⁸	1,49*10 ⁸
ss res	4,05*10 ⁷	2,80*10 ⁵
Avvik på måleområdet	0,158	0,0250
Nedre 95 % skjæringspunkt	- 8 663	218
Øvre 95 % skjæringspunkt	6 634	1489

Tabell A 42 Areal for benzylpenicillin sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	335 → 217
100	1 992*
100	4 002
100	2 687
100	3 198
100	6 778*
100	5 679

* Verdiene er tydelige avvik, og prøvene er valgt vekk videre

Tabell A 43 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til benzylpenicillin ved 600g/mL.

		335 → 217	
		% gjenfinning	
Blind			
Ren standard	35 221		
Spiket ekstrakt	46 279		
600	8 993	25,5	
600	17 454	49,8	
600	16 399	46,6	
600	20 269	57,5	
600	11 891	33,8	
	R^T gjennomsnitt	42,6	
	Standardavvik	12,9	
	RSD %	30,1	
	Max	57,5	
	Min	25,5	
Gjennomsnitt spike 600	15 019		
R^{MS}, matrikseffekt	1,314	131,4	
R^{PO}, i prøveopparbeidelsen	0,325	32,5	

Tabell A 44 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til benzylpenicillin ved 600 ng/mL.

335 → 217		
% gjenfinning		
Blind		
Ren standard	35 221	
Spiket ekstrakt	42 947	
600	8 326	23,6
600	21 489	61,0
600	16 930	48,1
600	20 308	57,7
600	26 110	74,1
	R^T Gjennomsnitt	52,9
	Standardavvik	18,8
	RSD %	35,6
	Max	74,1
	Min	23,6
Gjennomsnitt spike 600	18 633	
R^{MS}, matrikseffekt	1,219	121,9
R^{PO}, i prøveopparbeidelsen	0,434	43,4

Tabell A 45 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ciprofloksacin sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 332 → 314.2				Konfirmering 332 → 231.1				Konfirmering 332 → 288.2			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905				103 905		
25		63 407				63 407				63 407		
50		46 925				46 925				46 925		
100	9 587	59 337	0,162	0,797	4 718	59 337	0,080	0,797	3 996	59 337	0,067	0,797
300	19 857	60 505	0,328	0,797	11 990	60 505	0,198	0,797	9 010	60 505	0,149	0,797
600	45 902	76 130	0,603	0,792	31 326	76 130	0,411	0,792	21 224	76 130	0,279	0,792
600	27 942	31 661	0,883	0,792	20 102	31 661	0,635	0,792	18 152	31 661	0,573	0,792
600	33 331	59 068	0,564	0,792	23 843	59 068	0,404	0,792	18 890	59 068	0,320	0,792
600	29 474	28 998	1,016	0,792	21 428	28 998	0,739	0,792	16 289	28 998	0,562	0,792
600	31 985	13 767	2,323	0,792	23 403	13 767	1,700	0,792	15 661	13 767	1,138	0,792
600	89 961*	53 553	1,680*	0,792*	55 522*	53 553	1,037*	0,792*	50 512*	53 553	0,943*	0,792*
1200	110 644	60 282	1,835	0,792	75 015	60 282	1,244	0,792	57 037	60 282	0,946	0,792
Gjennomsnitt	33 727	43 863	1,078	0,793	24 020	43 863	0,778	0,793	18 043	43 863	0,636	0,793
Standardavvik	7 123	22 986	0,722	0,002	4 355	22 986	0,535	0,002	2 214	22 986	0,341	0,002
RSD	0,211	0,524	0,669	0,003	0,181	0,524	0,688	0,003	0,123	0,524	0,537	0,003
RSD %	21,1	52,4	66,9	0,3	18,1	52,4	68,8	0,3	12,3	52,4	53,7	0,3

* Prøven er en uteligger og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 46 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ciprofloksacin sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 332 → 314.2				Konfirmering 332 → 231.1				Konfirmering 332 → 288.2			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		
25		65 515				65 515				65 515		
50	1 807	47 825	0,038	0,797		47 825				47 825		
100	4 446	60 633	0,073	0,797	2 615	60 633	0,043	0,797	2 316	60 633	0,038	0,797
300	9 373	59 786	0,157	0,792	4 950	59 786	0,083	0,797	4 651	59 786	0,078	0,797
600	22 452	71 057	0,316	0,792	14 999	71 057	0,211	0,792	14 700	71 057	0,207	0,792
600	37 337*	49 238	0,758*	0,797	25 730*	49 238	0,523*	0,797	26 923*	49 238	0,547*	0,797
600	15 918	29 903	0,532	0,797	11 598	29 903	0,388	0,797	11 299	29 903	0,378	0,797
600	16 027	30 707	0,522	0,797	10 780	30 707	0,351	0,792	10 481	30 707	0,341	0,797
600	21 421	13 493	1,588	0,792	15 588	13 493	1,155	0,792	15 289	13 493	1,133	0,792
600	16 541	55 219	0,300	0,797	11 981	55 219	0,217	0,797	12 636	55 219	0,299	0,797
1200	45 161	58 605	0,771	0,792	30 415	58 605	0,519	0,792	30 116	58 605	0,514	0,792
Gjennomsnitt	18 472	41 603	0,651	0,795	12 989	41 603	0,464	0,795	12 881	41 603	0,458	0,795
Standardavvik	3 192	20 770	0,535	0,003	2 158	20 770	0,394	0,003	2 087	20 770	0,384	0,002
RSD	0,173	0,499	0,821	0,003	0,166	0,499	0,849	0,003	0,162	0,499	0,840	0,003
RSD %	17,3	49,9	82,1	0,3	16,6	49,9	84,9	0,3	16,2	49,9	84,0	0,3

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 47 Verdier for linearitetsrekken til ciprofloksacin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	332 → 314.2		332 → 231.1		332 → 288.2	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	94	38	66	26	49	26
Standardavvik stigningstall	7,4	1,2	4,5	1,8	5,0	1,8
Skjæringspunkt	-5 262	-317	-5 271	-1 187	-4 352	1 486
Standardavvik skjæringspunkt	5 122	731	3 087	1 259	3 456	1 259
R ²	0,988	0,997	0,991	0,990	0,980	0,990
Standardavvik y	6 174	1 118	3 720	1 518	4 166	1 518
F-verdi	160	1 013	214	206	97	206
Frihetsgrader	2	3	2	2	2	2
ss reg	6,11*10 ⁹	1,26*10 ⁹	2,96*10 ⁹	4,75*10 ⁸	1,68*10 ⁹	4,75*10 ⁸
ss res	7,62*10 ⁷	3,75*10 ⁶	2,79*10 ⁷	4,61*10 ⁶	3,47*10 ⁶	4,61*10 ⁶
Avvik på måleområdet	0,0790	0,0314	0,0683	0,0696	0,102	0,0696
Nedre 95 % skjæringspunkt	-27 302	-2 643	-18 553	-6 606	-19 223	-6 905
Øvre 95 % skjæringspunkt	16 778	2 008	8 010	4 232	10 519	3 933

Tabell A 48 Areal for ciprofloksacin sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	332 → 314.2		332 → 231.1		332 → 288.2	
100	3 220*		2 001*		1 899*	
100	9 242		5 101		4 672	
100	8 650		4 786		4 002	
100	7 920		4 205		4 302	
100	13 776*		8 233*		6 981*	
100	10 657		5 407		5 102	

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre

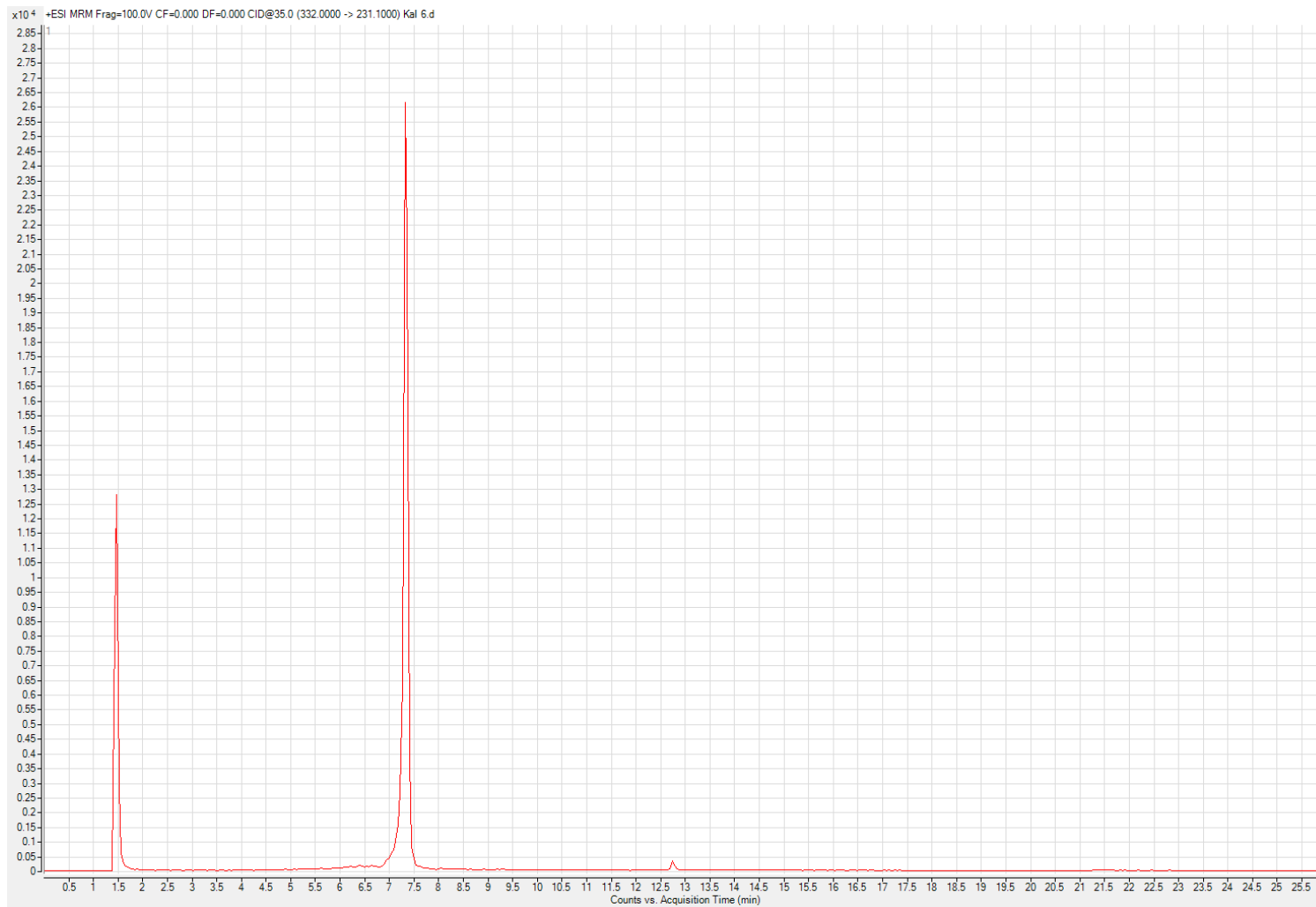
** Det relative ioneforholdet ligger nær det relative ioneforholdet for 100 ng/mL prøven under linearitetsrekken, ikke nær gjennomsnittet.

Tabell A 49 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ciprofloksacin ved 600 ng/mL.

	332 → 314.2		332 → 231.1		332 → 288.2	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	100 205		70 957		72 979	
Spiket ekstrakt	188 314		126 233		97 159	
600	45 902	45,8	31 326	44,1	21 224	29,1
600	27 942	27,9	20 102	28,3	18 152	24,9
600	33 331	33,3	23 843	33,6	18 890	25,9
600	29 474	29,4	21 428	30,2	16 289	22,3
600	31 985	31,9	23 403	33,0	15 661	21,5
	R^T gjennomsnitt	33,7	Gjennomsnitt	33,9	Gjennomsnitt	24,7
	Standardavvik	7,1	Standardavvik	6,1	Standardavvik	3,0
	RSD %	21,1	RSD %	18,1	RSD %	12,3
	Max	45,8	Max	44,1	Max	29,1
	Min	27,9	Min	28,3	Min	21,5
Gjennomsnitt spike						
600	33 727		24 020		18 043	
R^{MS} , matrikseffekt	1,879	187,9	1,779	177,9	1,331323975	133,1
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	0,179	17,9	0,190	19,0	0,185707102	18,6

Tabell A 50 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ciprofloksacin ved 600 ng/mL.

	332 → 314.2		332 → 231.1		332 → 288.2	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	97 236		66 841		72 316	
Spiket ekstrakt	153 381		103 729		85 299	
600	22 452	23,1	14 999	22,4	14 700	20,3
600	15 918	16,4	11 598	17,4	11 299	15,6
600	16 027	16,5	10 780	16,1	10 481	14,5
600	21 421	22,0	15 588	23,3	15 289	21,1
600	16 541	17,0	11 981	17,9	12 636	17,5
	R^T gjennomsnitt	19,0	Gjennomsnitt	19,4	Gjennomsnitt	17,8
	Standardavvik	3,3	Standardavvik	3,2	Standardavvik	2,9
	RSD %	17,3	RSD %	16,6	RSD %	16,2
	Max	23,1	Max	23,3	Max	21,1
	Min	16,4	Min	16,1	Min	14,5
Gjennomsnitt spike						
600	18 472		12 989		12 881	
R^{MS} , matrikseffekt	1,577	157,7	1,552	155,2	1,180	118,0
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	0,120	12,0	0,125	12,5	0,151	15,1



Figur A 2 Kvantifiseringstoppen til ciprofloxacin i ren standard ved konsentrasjon 1200 ng/mL Toppen ved ca. 1,5 minutter er av ukjent opprinnelse.

Tabell A 51 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ibuprofen sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvantifisering				
207 → 161				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		6 909		
25		5 348		
50		7 224		
100	1 204	3 945	0,305	1,004
300	4 201	6 151	0,683	1,004
600	8 424	5 736	1,469	1,004
600	9 125	5 499	1,659	1,004
600	8 126	4 411	1,842	1,004
600	7 304	5 646	1,294	1,004
600	7 795	6 100	1,278	1,004
600	20 332*	6 459	3,148*	1,004*
1200	15 831	8 333	1,900	1,004
Gjennomsnitt	8 155	5 642	1,508	1,004
Standardavvik	683	696	0,242	0,000
RSD	0,084	0,123	0,161	0,000
RSD %	8,4	12,3	16,1	0,0

* Prøven er en tydelig uteligger og er dermed valgt vekk videre

Tabell A 52 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ibuprofen sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvantifisering				
207 → 161				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		7 058		
25		5 517		
50		7 762		
100	1 415	3 945	0,359	1,004
300	3 660	5 866	0,624	1,004
600	7 181	5 266	1,364	1,004
600	3 168*	7 979	0,397*	1,007*
600	7 047	6 209	1,135	1,000
600	7 483	5 765	1,298	1,004
600	7 246	5 623	1,289	1,004
600	3 263	5 814	0,561	1,000
1200	8951	4 178	2,142	1,000
Gjennomsnitt	6 444	6 109	1,129	1,003
Standardavvik	1 785	965	0,328	0,002
RSD	0,277	0,158	0,291	0,002
RSD %	27,7	15,8	29,1	0,2

* Prøven er en tydelig uteligger.

Tabell A 53 Verdier for linearitetsrekken til ibuprofen beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Med ISTD		Uten ISTD	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	0,00145	0,0017	13,2	6,7
Standardavvik stigningstall	0,000313	0,00016	0,41	1,6
Skjæringspunkt	0,292	0,211	147	1 615
Standardavvik skjæringspunkt	0,212	0,111	281	1 120
R ²	0,917	0,981	0,998	0,895
Standardavvik y	0,256	0,134	338	1 349
F-verdi	22,2	106	1 052	17
Frihetsgrader	2	2	2	2
ss reg	1,45	1,89	1,20*10 ⁸	3,10*10 ⁷
ss res	0,131	0,0358	2,29*10 ⁶	3,64*10 ⁶
Avvik på måleområdet	0,212	0,0972	0,0308	0,242
Nedre 95 % skjæringspunkt	-0,621	-0,267	-1 061	- 3 204
Øvre 95 % skjæringspunkt	1,21	0,688	1 355	6 433

Tabell A 54 Areal for ibuprofen sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Med ISTD	Uten ISTD
100	0,489*	5 226*
100	0,408	1 798
100	0,499	1 106
100	0,455	972
100	1,450*	2 679*
100	0,740	1 578

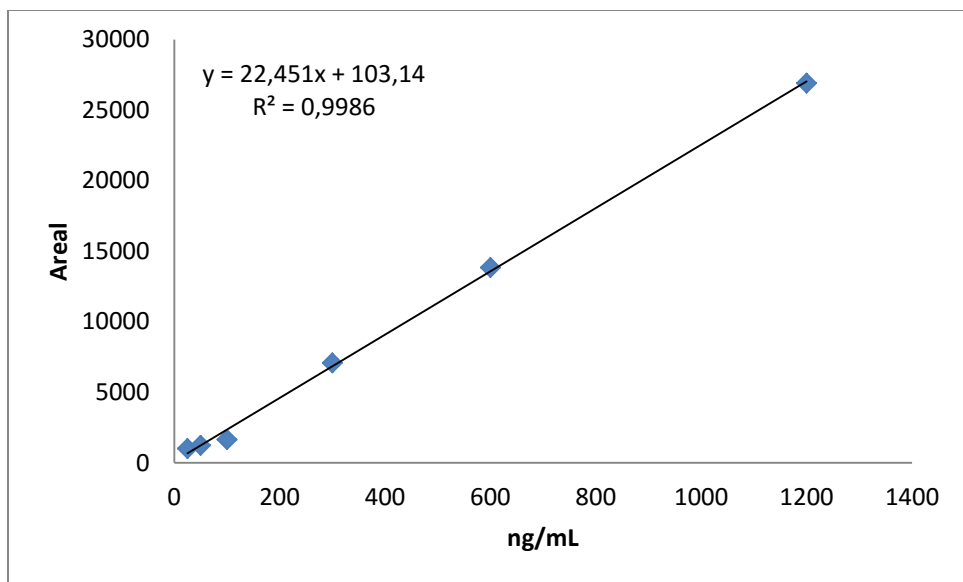
* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 55 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ibuprofen ved 600 ng/mL.

207 → 161		
% gjenfinning		
Blind		
Ren standard	11 978	
Spiket ekstrakt	9 646	
600	8 424	70,3
600	9 125	76,2
600	8 126	67,8
600	7 304	61,0
600	7 795	65,1
	R^T gjennomsnitt	68,1
	Standardavvik	5,7
	RSD %	8,4
	Max	76,2
	Min	61,0
Gjennomsnitt spike		
600	8 155	
R^{MS} , matrikseffekt	0,805	80,5
R^{PO} , i		
prøveopparbeidelsen	0,845	84,5

Tabell A 56 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ibuprofen ved 600 ng/mL.

207 → 161		
% gjenfinning		
Blind		
Ren standard	11 978	
Spiket ekstrakt	8 644	
600	7 181	60,0
600	7 047	58,8
600	7 483	62,5
600	7 246	60,5
600	3 263	27,2
	R^T gjennomsnitt	53,8
	Standardavvik	14,9
	RSD %	27,7
	Max	62,5
	Min	27,2
Gjennomsnitt spike		
600	6 444	
R^{MS}, matrikseffekt	0,722	72,2
R^{PO}, i		
prøveopparbeidelsen	0,746	74,6



Figur A 3 Kalibreringskurven for ibuprofen som ren standard løst i Milli-Q vann.

Tabell A 57 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ketoprofen sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 255 → 209				Konfirmering 255 → 105			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		6 909				6 909		
25		5 348				5 348		
50	13 900	7 224	1,92	1,004	11 513	7 224	1,59	1,004
100	26 015	3 945	6,60	1,000	20 525	3 945	5,20	1,000
300	64 466	6 151	10,48	1,004	51 980	6 151	8,45	1,004
600	170 540	5 736	29,73	1,004	137 090	5 736	23,90	1,004
600	161 504	5 499	29,47	1,004	130 605	5 499	23,75	1,004
600	172 712	4 411	39,16	1,004	137 073	4 411	31,08	1,004
600	164 285	5 646	29,10	1,004	129 825	5 646	23,00	1,004
600	159 056	6 100	26,08	1,004	128 293	6 100	21,03	1,004
600	357 280*	6 549	55,31*	1,004*	286 241*	6 549	44,315*	1,004*
1200	323 833	8 333	38,86	1,004	263 228	8 333	31,59	1,004
Gjennomsnitt	165 619	5 642	30,69	1,003	132 577	5 642	24,55	1,003
Standardavvik	5 838	696	4,95	0,001	4 195	696	3,82	0,001
RSD	0,035	0,123	0,161	0,001	0,032	0,123	0,156	0,001
RSD %	3,5	12,3	16,1	0,1	3,2	12,3	15,6	0,1

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre

Tabell A 58 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for ketoprofen sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 255 → 209				Konfirmering 255 → 105			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		7 058				7 058		
25		5 517				5 517		
50	13 194	7 762	1,70	1,332	10 173	7 762	1,31	1,332
100	24 148	3 945	6,12	1,332	18 620	3 945	4,72	1,332
300	61 966	5 866	10,56	1,332	49 438	5 866	8,43	1,332
600	156 435	5 266	29,71	1,332	123 299	5 266	23,42	1,332
600	326 520*	7 979	40,92*	1,337*	256 593*	7 979	5,211*	1,337*
600	155 227	6 209	25,00	1,332	121 526	6 209	19,57	1,332
600	147 471	5 765	25,58	1,332	115 297	5 765	20,00	1,332
600	147 485	5 623	26,23	1,332	116 593	5 623	20,73	1,332
600	151 343	5 814	26,03	1,337	117 776	5 814	20,26	1,337
1200	306 208	4 178	73,29	1,337	240 630	4 178	57,59	1,337
Gjennomsnitt	151 592	6 109	26,51	1,334	118 898	6 109	20,80	1,334
Standardavvik	4 201	965	1,85	0,002	3 384	965	1,52	0,002
RSD	0,028	0,158	0,070	0,002	0,028	0,158	0,073	0,002
RSD %	2,8	158	7,0	0,2	2,8	158	7,3	0,2

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre

Tabell A 59 Verdier for linearitetsrekken til ketoprofen beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering	
	255 → 209		255 → 105	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	274	259	223	203
Standardavvik stigningstall	10,9	8,3	8,6	6,2
Skjæringspunkt	-3 681	-3 951	-3 447	-3 067
Standardavvik skjæringspunkt	6 708	5 150	5 274	3 824
R ²	0,995	0,997	0,996	0,997
Standardavvik y	10 259	7 877	8 066	5 848
F-verdi	636	959	680	1 076
Frihetsgrader	3	3	3	3
ss reg	6,70*10 ¹⁰	5,95*10 ¹⁰	4,42*10 ¹⁰	3,68*10 ¹⁰
ss res	3,16*10 ⁸	1,86*10 ⁸	1,95*10 ⁸	1,03*10 ⁸
Avvik på måleområdet	0,0396	0,0323	0,0384	0,0305
Nedre 95 % skjæringspunkt	-25 029	-20 342	-20 231	-15 236
Øvre 95 % skjæringspunkt	17 667	12 440	13 337	9 102

Tabell A 60 Areal for ketoprofen sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering	
	255 → 209		255 → 105	
100	13 673*		10 223*	
100	23 451		18 211	
100	26 998		21 982	
100	22 763		17 667	
100	39 783*		35 986*	
100	28 987		22 763	

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 61 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til ketoprofen ved 600 ng/mL.

	255 → 209		255 → 105	
		% gjenfinning		% gjenfinning
Blind				
Ren standard	341 121		274 675	
Spiket ekstrakt	160 312		126 241	
600	170 540	50,0	137 090	49,9
600	161 504	47,3	130 605	47,5
600	172 712	50,6	137 073	49,9
600	164 285	48,2	129 825	47,3
600	159 056	46,6	128 293	46,7
	R^T gjennomsnitt	48,6	Gjennomsnitt	48,3
	Standardavvik	1,7	Standardavvik	1,5
	RSD %	3,5	RSD %	3,2
	Max	50,6	Max	49,9
	Min	46,6	Min	46,7
Gjennomsnitt spike				
600	165 619		132 577	
R^{MS} , matrikseffekt	0,470	47,0	0,460	46,0
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	1,033	103,3	1,050	105,0

Tabell A 62 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til ketoprofen ved 600 ng/mL.

	255 → 209		255 → 105	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	315 446		240 459	
Spiket ekstrakt	138 984		108 914	
600	156 435	49,6	123 299	51,3
600	155 227	49,2	121 526	50,5
600	147 471	46,8	115 297	47,9
600	147 485	46,8	116 593	48,5
600	151 343	48,0	117 776	49,0
	R^T gjennomsnitt	48,1	Gjennomsnitt	49,4
	Standardavvik	1,3	Standardavvik	1,4
	RSD %	2,8	RSD %	2,8
	Max	49,6	Max	51,3
	Min	46,8	Min	47,9
Gjennomsnitt spike				
600	151 592		118 898	
R^{MS} , matrikseffekt	0,441	44,1	0,453	45,3
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	1,091	109,1	1,092	109,2

Tabell A 63 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for koffein sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvantifisering				
195.3 → 138				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905		
50		63 407		
100		46 925		
200	8 299	59 337	0,140	0,695
600	16 559	60 505	0,274	0,691
1200	58 150	76 130	0,764	0,691
1200	42 284	31 661	1,336	0,691
1200	58 800	59 068	0,995	0,695
1200	59 663	28 998	2,058	0,695
1200	52 701	13 767	3,828	0,691
1200	114 365*	53 553	2,136*	0,691*
2400	105 860	60 282	1,883	0,691
Gjennomsnitt	54 320	43 863	1,796	0,693
Standardavvik	7 259	22 986	1,237	0,002
RSD	0,134	0,524	0,688	0,003
RSD %	13,4	52,4	68,8	0,3

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 64 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for koffein sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Kvalifisering				
195.3 → 138				
Prøve	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006		
50		65 515		
100		47 825		
200	8 542	60 633	0,141	0,696
600	17 899	59 786	0,299	0,696
1200	59 029	71 057	0,831	0,691
1200	123 146*	49 238	2,501*	0,696*
1200	64 669	29 903	2,163	0,691
1200	44 275	30 707	1,442	0,696
1200	56 755	13 493	4,206	0,691
1200	60 784	55 219	1,101	0,696
2400	118 413	58 605	2,021	0,691
Gjennomsnitt	57 103	41 603	1,948	0,693
Standardavvik	7 733	20 770	1,357	0,003
RSD	0,135	0,499	0,697	0,004
RSD %	13,5	49,9	69,7	0,4

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 65 Areal for koffein sine S-prøver ved 200 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering 195.3 → 138
200	-*
200	8 236
200	7 920
200	7 160
200	13 465*
200	9 022

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 66 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for losartan sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvalifisering 423.2 → 207.2				Konfirmering 423.2 → 377.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905		
25		63 407				63 407		
50	55 296	46 925	1,178	1,242	38 916	46 925	0,829	1,242
100	63 249	59 337	1,066	1,242	41 958	59 337	0,707	1,242
300	127 041	60 505	2,100	1,236	30 157	60 505	0,498	1,231
600	289 498	76 130	3,803	1,236	66 352	76 130	0,872	1,231
600	297 933	31 661	9,410	1,231	50 623	31 661	1,599	1,231
600	316 940	59 068	5,366	1,242	66 029	59 068	1,118	1,242
600	291 970	28 998	10,069	1,242	58 461	28 998	2,016	1,242
600	250 135	13 767	18,169	1,236	49 237	13 767	3,576	1,231
600	191 145*	53 553	3,569*	1,241*	148 065*	53 553	0,276*	1,241*
1200	644 242	60 282	10,687	1,241	116 215	60 282	1,928	1,241
Gjennomsnitt	289 295	43 863	9,363	1,238	58 141	43 863	1,836	1,237
Standardavvik	24 391	22 986	5,589	0,004	8 148	22 986	1,068	0,006
RSD	0,084	0,524	0,597	0,003	0,140	0,524	0,582	0,005
RSD %	8,4	52,4	59,7	0,3	14,0	52,4	58,2	0,5

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre

Tabell A 67 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for losartan sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvalifisering 423.2 → 207.2				Konfirmering 423.2 → 377.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006		
25		65 515				65 515		
50	28 284	47 825	0,591	1,231	6 130	47 825	0,128	1,231
100	95 562	60 633	1,576	1,231	31 576	60 633	0,521	1,231
300	64 771	59 786	1,083	1,231	24 668	59 786	0,413	1,231
600	152 072	71 057	2,140	1,231	58 241	71 057	0,820	1,231
600	327 767*	49 238	6,657*	1,236*	112 311*	49 238	2,281*	1,236*
600	139 445	29 903	4,663	1,241	46 562	29 903	1,557	1,241
600	141 357	30 707	4,603	1,231	52 607	30 707	1,713	1,241
600	148 097	13 493	10,976	1,231	42 221	13 493	3,129	1,231
600	131 707	55 219	2,385	1,241	40 111	55 219	0,726	1,241
1200	293 170	58 605	5,002	1,241	111 906	58 605	1,910	1,241
Gjennomsnitt	142 536	41 603	4,954	1,241	47 948	41 603	1,589	1,235
Standardavvik	7 907	20 770	3,570	0,005	7 480	20 770	0,965	0,005
RSD	0,055	0,499	0,721	0,004	0,156	0,499	0,607	0,004
RSD %	5,5	49,9	72,1	0,4	15,6	49,9	60,7	0,4

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 68 Verdier for linearitetsrekken til losartan beregnet ved Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering	
	423.2 → 207.2		423.2 → 377.1	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	521	211	70,	85
Standardavvik stigningstall	32	34	14	11
Skjæringspunkt	1 615	31 608	27 200	8 350
Standardavvik skjæringspunkt	19 695	20 829	8 327	7 028
R ²	0,989	0,930	0,900	0,949
Standardavvik y	30 121	31 856	12 735	10 749
F-verdi	266	39	27	55
Frihetsgrader	3	3	3	3
ss reg	2,41*10 ¹¹	3,98*10 ¹⁰	4,37*10 ⁹	6,40*10 ⁹
ss res	2,72*10 ⁹	3,04*10 ⁹	4,87*10 ⁸	3,47*10 ⁸
Avvik på måleområdet	0,0613	0,160	0,193	0,134
Nedre 95 % skjæringspunkt	-61 063	-34 679	701	-14 017
Øvre 95 % skjæringspunkt	64 293	97 895	53 698	30 716

Tabell A 69 Areal for losartan sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering	
	423.2 → 207.2		423.2 → 377.1	
100	20 992*		15 987*	
100	60 788		40 072	
100	55 089		36 724	
100	58 793		39 986	
100	85 001*		57 889*	
100	65 798		46 237	

* Prøvene er tydelige avvik, og er derfor valgt vekk videre

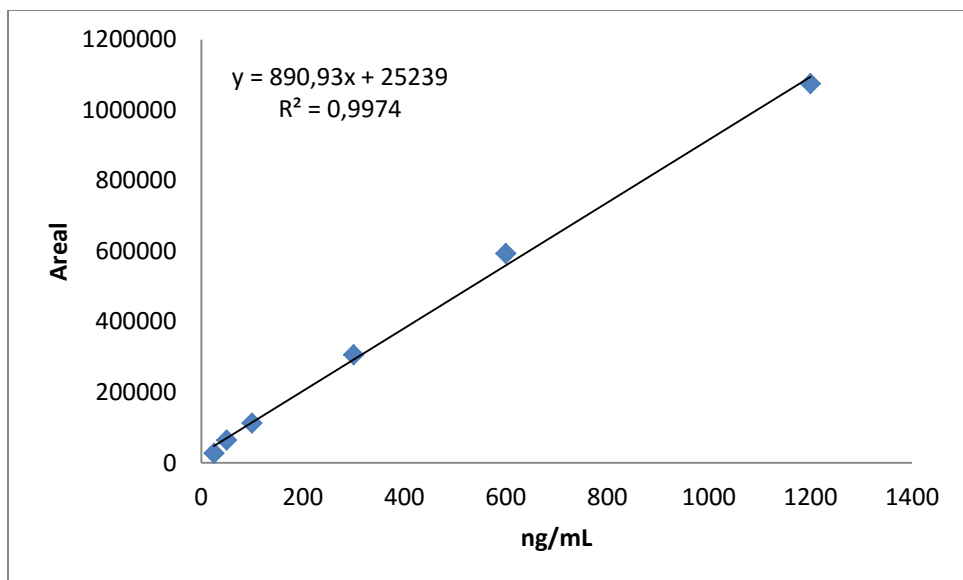
** Ioneforholdet lå langt fra gjennomsnittlig ioneforhold, men tett opp til ioneforhold observert for 50 ng/mL og 100 ng/mL prøvene i linearitetsrekken.

Tabell A 70 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} S-prøvene til losartan ved 600 ng/mL.

	423.2 → 207.2		423.2 → 377.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	573 943		123 343	
Spiket ekstrakt	107 567		47 318	
600	289 498	50,4	66 352	53,8
600	297 933	51,9	50 623	41,0
600	316 940	55,2	66 029	53,5
600	291 970	50,9	58 461	47,4
600	250 135	43,6	49 237	39,9
	R^T gjennomsnitt	50,4	Gjennomsnitt	47,1
	Standardavvik	4,2	Standardavvik	6,6
	RSD %	8,4	RSD %	14,0
	Max	55,2	Max	53,8
	Min	43,6	Min	39,9
Gjennomsnitt spike				
600	289 295		58 141	
R^{MS} , matrikseffekt	0,187	18,7	0,384	38,4
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	2,689	268,9	1,229	122,9

Tabell A 71 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til losartan ved 600 ng/mL.

	423.2 → 207.2		423.2 → 377.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	573 943		123 343	
Spiket ekstrakt	140 452		139 755	
600	152 072	26,5	58 241	47,2
600	139 445	24,3	46 562	37,7
600	141 357	24,6	52 607	42,7
600	148 097	25,8	42 221	34,2
600	131 707	22,9	40 111	32,5
	R^T gjennomsnitt	24,8	Gjennomsnitt	38,9
	Standardavvik	1,4	Standardavvik	6,1
	RSD %	5,5	RSD %	15,6
	Max	26,5	Max	47,2
	Min	22,9	Min	32,5
Gjennomsnitt spike				
600	142 536		47 948	
R^{MS} , matrikseffekt	0,245	24,5	1,133	113,3
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	1,015	101,5	0,343	34,3



Figur A 4 Kalibreringskurven for losartan sitt kvantifiseringsion som ren standard løst i Milli-Q vann.

Tabell A 72 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metoprolol sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 268.2 → 56.1				Konfirmering 268.2 → 72.1				Konfirmering 268.2 → 116.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905		0,858		103 905		0,858		103 905		0,858
25		63 407		0,862		63 407		0,862		63 407		0,862
50	3 043	46 925	0,065	0,862	2 584	46 925	0,055	0,862	2 475	46 925	0,053	0,862
100	23 632	59 337	0,398	0,862	21 934	59 337	0,370	0,862	21 935	59 337	0,370	0,862
300	69 096	60 505	1,142	0,858	60 640	60 505	1,002	0,858	66 451	60 505	1,098	0,858
600	176 419	76 130	2,317	0,858	155 731	76 130	2,046	0,858	171 957	76 130	2,259	0,858
600	135 257	31 661	4,272	0,858	120 685	31 661	3,812	0,858	132 154	31 661	4,174	0,858
600	143 418	59 068	2,428	0,862	125 949	59 068	2,132	0,862	136 429	59 068	2,310	0,862
600	162 947	28 998	5,619	0,862	143 066	28 998	4,934	0,862	156 552	28 998	5,399	0,862
600	166 681	13 767	12,107	0,858	146 491	13 767	10,641	0,858	161 356	13 767	11,721	0,858
600	393 197*	53 553	7,342*	0,858*	344 236*	53 553	6,241*	0,858*	382 194*	53 553	7,137*	0,858*
1200	335 707	60 282	5,569	0,858	297 562	60 282	4,936	0,858	331 300	60 282	5,496	0,858
Gjennomsnitt	156 944	43 863	5,349	0,860	138 384	43 863	4,713	0,860	151 690	43 863	5,172	0,860
Standardavvik	17 054	22 986	4,020	0,002	14 633	22 986	3,528	0,002	16 900	22 986	3,893	0,002
RSD	0,109	0,524	0,752	0,003	0,106	0,524	0,749	0,003	0,111	0,524	0,753	0,003
RSD %	10,9	52,4	75,2	0,3	10,6	52,4	74,9	0,3	11,1	52,4	75,3	0,3

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 73 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metoprolol sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 268.2 → 56.1				Konfirmering 268.2 → 72.1				Konfirmering 268.2 → 116.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		
25		65 515				65 515				65 515		
50	5 026	47 825	0,105	0,858	4 523	47 825	0,095	0,858	4 072	47 825	0,085	0,858
100	22 900	60 633	0,378	0,858	19 271	60 633	0,318	0,858	20 873	60 633	0,344	0,858
300	65 651	59 786	1,098	0,858	56 531	59 786	0,946	0,858	62 362	59 786	1,043	0,858
600	167 746	71 057	2,361	0,858	147 642	71 057	2,078	0,858	159 371	71 057	2,243	0,858
600	362 208*	49 238	7,356*	0,858*	313 877*	49 238	6,375*	0,858*	348 279*	49 238	7,073*	0,858*
600	160 858	29 903	5,379	0,858	138 320	29 903	4,626	0,858	152 833	29 903	5,111	0,858
600	128 464	30 707	4,184	0,858	115 621	30 707	3,765	0,858	125 580	30 707	4,090	0,858
600	155 178	13 493	11,501	0,858	132 861	13 493	9,847	0,858	150 091	13 493	11,124	0,858
600	134 093	55 219	2,428	0,858	112 767	55 219	2,042	0,858	124 148	55 219	2,248	0,858
1200	329 799	58 605	5,627	0,858	285 891	58 605	4,878	0,858	315 383	58 605	5,382	0,858
Gjennomsnitt	149 268	41 603	5,171	0,858	129 442	41 603	4,472	0,858	142 405	41 603	4,963	0,858
Standardavvik	17 130	20 770	3,758	0,000	14923	20 770	3,203	0,000	16 371	20 770	3,657	0,000
RSD	0,115	0,499	0,727	0,000	0,115	0,499	0,716	0,000	0,115	0,499	0,737	0,000
RSD %	11,5	49,9	72,7	0,0	11,5	49,9	71,6	0,0	11,5	49,9	73,7	0,0

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 74 Areal for metoprolol sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering 268.2 → 56.1	Konfirmering 268.2 → 72.1	Konfirmering 468.2 → 116.1
100	15 623*	14 992*	14 567*
100	22 226	21 372	22 086
100	21 092	19 272	20 726
100	18 626	17 664	18 998
100	29 887*	27 987*	28 234*
100	24 224	23 276	23 998

*Prøvene er tydelige avvik, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 75 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metronidazol sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er gitt for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 172 → 128				Konfirmering 172 → 82			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905		
25	8 958	63 407	0,141	0,526	2 782	63 407	0,044	0,526
50	27 970	46 925	0,596	0,531	5 990	46 925	0,128	0,531
100	57 853	59 337	0,975	0,526	11 335	59 337	0,191	0,526
300	131 434	60 505	2,172	0,524	26 183	60 505	0,433	0,524
600	319 328	76 130	4,195	0,529	63 422	76 130	0,833	0,529
600	289 321	31 661	9,138	0,529	35 238	31 661	1,113	0,529
600	213 747	59 068	3,619	0,531	31 119	59 068	0,527	0,531
600	333 807	28 998	11,511	0,531	40 245	28 998	1,388	0,531
600	246 792	13 767	17,926	0,529	29 859	13 767	2,169	0,529
600	621 441*	53 553	11,604*	0,529*	87 787*	53 553	1,639*	0,524*
1200	569 251	60 282	9,443	0,524	103 203	60 282	1,712	0,524
Gjennomsnitt	280 599	43 863	9,278	0,528	39 977	43 863	1,206	0,528
Standardavvik	50 048	22 986	5,867	0,003	13 721	22 986	0,626	0,003
RSD	0,178	0,524	0,632	0,006	0,343	0,524	0,519	0,006
RSD %	17,8	52,4	63,2	0,6	34,3	52,4	51,9	0,6

*Prøvene er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 76 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for metronidazol sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 172 → 128				Konfirmering 172 → 82			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006		
25	8 773	65 515	0,134	0,524		65 515		0,524
50	25 152	47 825	0,526	0,529	4 183	47 825	0,087	0,529
100	47 113	60 633	0,777	0,529	7 875	60 633	0,130	0,524
300	114 028	59 786	1,907	0,529	19 809	59 786	0,331	0,524
600	267 089	71 057	3,759	0,529	46 738	71 057	0,634	0,529
600	494 645*	49 238	10,046*	0,529*	88 308*	49 238	1,793*	0,529*
600	263 566	29 903	8,814	0,524	45 851	29 903	1,533	0,524
600	242 318	30 707	7,891	0,529	36 896	30 707	1,202	0,529
600	196 549	13 493	14,567	0,524	33 240	13 493	2,464	0,524
600	173 913	55 219	3,150	0,529	29 211	55 219	0,529	0,529
1200	498 467	58 605	8,506	0,529	75 943	58 605	1,296	0,529
Gjennomsnitt	228 687	41 603	7,636	0,527	38 048	41 603	1,272	0,526
Standardavvik	41 563	20 770	4,600	0,002	7 286	20 770	0,783	0,003
RSD	0,182	0,499	0,602	0,005	0,191	0,499	0,615	0,005
RSD %	18,2	49,9	60,2	0,5	19,1	49,9	61,5	0,5

*Prøvene er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 77 Areal for metronidazol sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering 127 → 128	Konfirmering 172 → 82
100	28 223*	6 778*
100	50 968	10 456
100	72 568	13 082
100	60 998	11 447
100	120 698*	23 001*
100	46 055	9 662

*Prøvene er tydelige avvik, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 78 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for prednisolon sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er gitt for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 361.4 → 343.2				Konfirmering 361.4 → 147				Konfirmering 361.4 → 171			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905				103 905		
25		63 407		1,098		63 407				63 407		
50	7 473	46 925	0,159	1,098	1 394	46 925	0,030	1,098		46 925		
100	10 548	59 337	0,178	1,103	2 492	59 337	0,042	1,103	1 074	59 337	0,018	1,103
300	17 329	60 505	0,286	1,098	5 141	60 505	0,085	1,098	2 270	60 505	0,038	1,098
600	55 009	76 130	0,723	1,098	19 115	76 130	0,251	1,098	8 099	76 130	0,106	1,098
600	42 782	31 661	1,351	1,098	13 483	31 661	0,426	1,098	5 353	31 661	0,169	1,098
600	56 854	59 068	0,963	1,103	19 971	59 068	0,338	1,103	6 921	59 068	0,117	1,103
600	62 610	28 998	2,159	1,103	20 750	28 998	0,716	1,098	9 418	28 998	0,325	1,098
600	58 206	13 767	4,228	1,098	17 069	13 767	1,240	1,098	7 424	13 767	0,539	1,098
600	86 842*	53 553	1,622*	1,093*	30 506*	53 553	0,570*	1,098*	10 932*	53 553	0,204*	1,098*
1200	109 788	60 282	1,821	1,098	32 945	60 282	0,547	1,098	16 343	60 282	0,271	1,098
Gjennomsnitt	55 092	43 863	1,885	1,100	18 078	43 863	0,594	1,099	7 443	43 863	0,251	1,099
Standardavvik	7 431	22 986	1,419	0,003	2 912	22 986	0,401	0,002	1 498	22 986	0,183	0,002
RSD	0,135	0,524	0,753	0,002	0,161	0,524	0,675	0,002	0,201	0,524	0,728	0,002
RSD %	13,5	52,4	75,3	0,2	16,1	52,4	67,5	0,2	20,1	52,4	72,8	0,2

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 79 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for prednisolon sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er gitt for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 361.4 → 343.2				Konfirmering 361.4 → 147				Konfirmering 361.4 → 171			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		
25		65 515				65 515				65 515		
50	5 826	47 825	0,122	1,098		47 825				47 825		1,098
100	10 560	60 633	0,174	1,098	2 727	60 633	0,045	1,098	1 193	60 633	0,020	1,098
300	18 690	59 786	0,313	1,098	5 191	59 786	0,087	1,098	2 760	59 786	0,046	1,098
600	54 551	71 057	0,768	1,098	15 029	71 057	0,212	1,098	7 869	71 057	0,111	1,098
600	82 579*	49 238	1,677*	1,098*	28 521*	49 238	0,579*	1,098*	12 591*	49 238	0,256*	1,098*
600	35 753	29 903	1,196	1,093	17 394	29 903	0,582	1,098	4 239	29 903	0,142	1,093
600	24 122	30 707	0,786	1,103	21 230	30 707	0,691	1,093	7 412	30 707	0,241	1,093
600	33 690	13 493	2,497	1,093	16 911	13 493	1,253	1,098	4 103	13 493	0,304	1,093
600	33 410	55 219	0,605	1,093	16 986	55 219	0,308	1,098	7 159	55 219	0,130	1,098
1200	110 325	58 605	1,883	1,098	38 349	58 605	0,654	1,098	14 453	58 605	0,247	1,098
Gjennomsnitt	36 305	41 603	1,170	1,097	17 510	41 603	0,609	1,097	76 156	41 603	0,186	1,096
Standardavvik	11 145	20 770	0,773	0,003	2 272	20 770	0,410	0,002	1 831	20 770	0,083	0,003
RSD	0307	0,499	0,661	0,003	0,130	0,499	0,673	0,002	0,297	0,499	0,449	0,002
RSD %	30,7	49,9	66,1	0,3	13,0	49,9	67,3	0,2	29,7	49,9	44,9	0,2

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 80 Verdier for linearitetsrekken til prednisolon, beregnet ved Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	361.4 → 343.2		361.4 → 147		361.4 → 171	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	91	92	28	34	15	12
Standardavvik stigningstall	6,3	5,2	2,4	3,3	1,1	0,87
Skjæringspunkt	- 1084	-1 519	-612	-3 132	-1 006	-0255
Standardavvik skjæringspunkt	3 891	3 229	1 488	2 247	768	597
R ²	0,986	0,990	0,979	0,981	0,988	0,990
Standardavvik y	5 950	4 939	2 276	2 709	926	720
F-verdi	210	310	140	106	168	205
Frihetsgrader	3	3	3	2	2	2
ss reg	7,43*10 ⁹	7,57*10 ⁹	7,23*10 ⁸	7,77*10 ⁸	1,44*10 ⁸	1,06*10 ⁸
ss res	1,06*10 ⁸	7,32*10 ⁷	1,55*10 ⁷	1,47*10 ⁷	1,71*10 ⁶	1,04*10 ⁶
Avvik på måleområdet	0,0690	0,0568	0,0846	0,0972	0,0771	0,0699
Nedre 95 % skjæringspunkt	-13 466	-11 797	-5 348	-12 802	- 4 311	-2 826
Øvre 95 % skjæringspunkt	11 297	8 759	4 123	6 537	2 299	1 034

Tabell A 81 Areal for prednisolon sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	361.4 → 343.2		361.4 → 147		361.4 → 171	
100	5 678*		-*		-*	
100	12 998		3 655		1 198	
100	9 765		3 116		969	
100	8445		2 485		732	
100	20 628*		7 998*		3 088*	
100	11 730		4 001		1 308	

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 82 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til prednisolon ved 600 ng/mL.

	361.4 → 343.2		361.4 → 147		361.4 → 171	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	212 375		77 083		32 617	
Spiket ekstrakt	38 163		10 865		4 532	
600	55 009	25,9	19 115	24,8	8 099	24,8
600	42 782	20,1	13 483	17,5	5 353	16,4
600	56 854	26,8	19 971	25,9	6 921	21,2
600	62 610	29,5	20 750	26,9	9 418	28,9
600	58 206	27,4	17 069	22,1	7 424	22,8
	R^T gjennomsnitt	25,9	Gjennomsnitt	23,5	Gjennomsnitt	22,8
	Standardavvik	3,5	Standardavvik	3,8	Standardavvik	4,6
	RSD %	13,5	RSD %	16,1	RSD %	20,1
	Max	29,5	Max	26,9	Max	28,9
	Min	20,1	Min	17,5	Min	16,4
Gjennomsnitt spike						
600	55 092		18 078		7 443	
R^{MS} , matrikseffekt	0,180	18,0	0,141	14,1	0,139	13,9
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	1,444	144,4	1,664	166,4	1,642	164,2

Tabell A 83 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til prednisolon ved 600 ng/mL.

	361.4 → 343.2		361.4 → 147		361.4 → 171	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	203 108		73 717		31 039	
Spiket ekstrakt	62 985		20 421		9 366	
600	54 551	26,9	15 029	20,4	7 869	25,4
600	35 753	17,6	17 394	23,6	4 239	13,7
600	24 122	11,9	21 230	28,8	7 412	23,9
600	33 690	16,6	16 911	22,9	4 103	13,2
600	33 410	16,4	16 986	23,0	7 159	23,1
	R^T gjennomsnitt	17,9	Gjennomsnitt	23,8	Gjennomsnitt	19,8
	Standardavvik	5,5	Standardavvik	3,1	Standardavvik	5,9
	RSD %	30,7	RSD %	13,0	RSD %	29,7
	Max	26,9	Max	28,8	Max	25,4
	Min	11,9	Min	20,4	Min	13,2
Gjennomsnitt spike						
600	36 305		17 510		6 156	
R^{MS} , matrikseffekt	0,310	31,0	0,277	27,7	0,302	30,2
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	0,576	57,6	0,857	85,7	0,657	65,7

Tabell A 84 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for simvastatin sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 419.3 → 285.2				Konfirmering 419.3 → 199.2			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		6 909				6 909		
25		5 348				5 348		
50		7 224				7 224		
100	6 080	3 945	1,541	1,154	4 112	3 945	1,043	1,154
300	10 047	6 151	1,634	1,154	8 359	6 151	1,359	1,154
600	75 174	5 736	13,107	1,157	67 100	5 736	11,699	1,157
600	59 429	6 100	10,806	1,160	54 280	6 100	8,899	1,160
600	35 011	4 411	7,937	1,160	31 299	4 411	5,868	1,160
600	26 976	5 646	4,937	1,154	24 305	5 646	4,305	1,154
600	28 239	6 459	4,629	1,154	45 883	6 459	7,462	1,154
600	51 995*	5 499	8,050*	1,157*	48 197*	5 499	7,462*	1,157*
1200	106 715	8 333	12,806	1,157	97 297	8 333	11,676	1,157
Gjennomsnitt	44 966	5642	8,252	1,156	44 573	5 642	8,098	1,156
Standardavvik	21 356	696	3,721	0,003	17 251	696	2,821	0,002
RSD	0,475	0,123	0,451	0,002	0,387	0,123	0,348	0,002
RSD %	47,5	12,3	45,1	0,2	38,7	12,3	34,8	0,2

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 85 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for simvastatin sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 419.3 → 285.2				Konfirmering 419.3 → 199.2			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		7 058				7 058		
25		5 517				5 517		
50		7 762				7 762		
100	4 387	3 945	1,112	1,160	3 881	3 945	0,984	1,160
300	18 859	5 866	3,215	1,157	7 185	5 866	1,225	1,160
600	32 149	5 266	6,105	1,160	28 239	5 266	5,363	1,160
600	91 398*	6 209	14,720*	1,157*	82 311*	6 209	13,256*	1,157*
600	22 215	5 765	3,853	1,160	20 875	5 765	3,621	1,160
600	25 541	5 623	4,542	1,160	23 563	5 623	4,190	1,160
600	26 691	5 814	4,591	1,160	22 634	5 814	3,893	1,160
600	64 886	4 178	15,530	1,157	57 936	4 178	13,867	1,157
1200	100 924	7 979	12,649	1,157	90 429	7 979	11,334	1,157
Gjennomsnitt	34 296	5 476	6,924	1,159	30 649	5 476	6,187	1,160
Standardavvik	17 470	705	4,881	0,002	15 495	705	4,344	0,001
RSD	0,509	0,129	0,705	0,001	0,506	0,129	0,702	0,001
RSD %	50,9	12,9	70,5	0,1	50,6	12,9	70,2	0,1

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 86 Verdier for linearitetsrekken til simvastatin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering	
	419.3 → 285.2		419.3 → 199.2	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	98,4	87,7	90,8	82,1
Standardavvik stigningstall	22,5	11,3	19,9	11,5
Skjæringspunkt	-4 600	-9 160	-5 727	-12 721
Standardavvik skjæringspunkt	15 495	7 808	13 702	7 938
R ²	0,905	0,968	0,913	0,962
Standardavvik y	18 676	9 411	16 514	9 567
F-verdi	19	60	21	51
Frihetsgrader	2	2	2	2
ss reg	6,68*10 ⁹	5,31*10 ⁹	5,69*10 ⁹	4,65*10 ⁹
ss res	6,96*10 ⁸	1,77*10 ⁸	5,45*10 ⁸	1,83*10 ⁸
Avvik på måleområdet	0,229	0,129	0,219	0,140
Nedre 95 % skjæringspunkt	-71 271	-42 756	-64 682	-46 876
Øvre 95 % skjæringspunkt	62 072	24 435	53 227	21 434

Tabell A 87 Areal for simvastatin sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering	
	419.3 → 285.2		419.3 → 199.2	
100	3 245*		-*	
100	4 987		2 972	
100	5 276		3 168	
100	6 508		4 988	
100	8 224*		5 667*	
100	7 877		5 252	

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er dermed valgt vekk videre.

** Ionene viser et annet relativt ioneforhold enn gjennomsnittet, men viser omtrentlig samme forhold som det sett for 100 ng/mL prøven i linearitetsrekken.

Tabell A 88 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til simvastatin ved 600 ng/mL.

	419.3 → 285.2		419.3 → 199.2	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	96 459		82 667	
Spiket ekstrakt	51 019		46 949	
600	75 174	77,9	67 100	81,2
600	59 429	61,6	54 280	65,7
600	35 011	36,3	31 299	37,9
600	26 976	28,0	24 305	29,4
600	28 239	29,3	45 883	55,5
	R^T gjennomsnitt	46,6	Gjennomsnitt	53,9
	Standardavvik	22,1	Standardavvik	20,9
	RSD %	47,5	RSD %	38,7
	Max	77,9	Max	81,2
	Min	28,0	Min	29,4
Gjennomsnitt spike				
600	44 966		44 573	
R^{MS} , matrikseffekt	0,529	52,9	0,568	56,8
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	0,881	88,1	0,949	94,9

Tabell A 89 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til simvastatin ved 600 ng/mL.

	419.3 ->285.2		419.3 → 199.2	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	131 418		114 446	
Spiket ekstrakt	95 131		84 306	
600	32 149	24,5	28 239	24,7
600	22 215	16,9	20 875	18,2
600	25 541	19,4	23 563	20,6
600	26 691	20,3	22 634	19,8
600	64 886	49,4	57 936	50,6
	R^T gjennomsnitt	26,1	Gjennomsnitt	26,8
	Standardavvik	13,3	Standardavvik	13,5
	RSD %	50,9	RSD %	50,6
	Max	49,4	Max	50,6
	Min	16,9	Min	18,2
Gjennomsnitt spike				
600	34 296		30 649	
R^{MS} , matrikseffekt	0,724	72,4	0,737	73,7
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	0,361	36,1	0,364	36,4

Tabell A 90 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfadoxin sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet fra kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 311 → 156				Konfirmering 311 → 107.9				Konfirmering 311 → 92			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905				103 905		
25	7 691	63 407	0,121	1,005	2 726	63 407	0,043	1,005	3 053	63 407	0,048	1,005
50	12 490	46 925	0,266	1,005	4 281	46 925	0,091	1,005	4 906	46 925	0,105	1,005
100	30 802	59 337	0,519	1,005	10 315	59 337	0,174	1,005	12 252	59 337	0,206	1,005
300	65 533	60 505	1,083	1,005	21 671	60 505	0,358	1,000	26 350	60 505	0,435	1,000
600	199 983	76 130	2,627	1,000	68 232	76 130	0,896	1,000	78 457	76 130	1,031	1,000
600	149 028	31 661	4,707	1,000	51 586	31 661	1,629	1,000	58 486	31 661	1,847	1,000
600	163 787	59 068	2,773	1,005	56 807	59 068	0,962	1,005	64 227	59 068	1,087	1,005
600	180 680	28 998	6,231	1,005	61 869	28 998	2,134	1,005	71 590	28 998	2,469	1,005
600	182 900	13 767	13,285	1,000	62 763	13 767	4,559	1,000	73 048	13 767	5,306	1,000
600	337 838*	53 553	6,308*	1,000	114 677*	53 553	2,141*	1,000*	132 476*	53 553	2,474*	1,000*
1200	361 044	60 282	5,989	1,000	122 715	60 282	2,036	1,000	142 753	60 282	2,368	1,000
Gjennomsnitt	175 276	43 863	5,925	1,003	60 251	43 863	2,036	1,003	69 162	43 863	2,348	1,003
Standardavvik	19 485	22 986	4,375	0,003	6 316	22 986	1,499	0,003	7 838	22 986	1,756	0,003
RSD	0,111	0,524	0,738	0,003	0,105	0,524	0,736	0,003	0,113	0,524	0,748	0,003
RSD %	11,1	52,4	73,8	0,3	10,5	52,4	73,6	0,3	11,3	52,4	74,8	0,3

* Prøven er en uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 91 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfadoxin sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 311 → 156				Konfirmering 311 → 107.9				Konfirmering 311 → 92			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		
25	7 551	65 515	0,115	1,000	2 708	65 515	0,041	1,000	3 242	65 515	0,049	1,000
50	12 593	47 825	0,263	1,000	4 225	47 825	0,088	1,000	4 958	47 825	0,104	1,000
100	30 717	60 633	0,507	1,005	10 872	60 633	0,179	1,005	12 156	60 633	0,200	1,005
300	64 936	59 786	1,086	1,005	21 733	59 786	0,364	1,005	26 307	59 786	0,440	1,005
600	190 237	71 057	2,677	1,005	66 095	71 057	0,930	1,005	76 411	71 057	1,075	1,000
600	309 027*	49 238	6,276*	1,005*	109 441*	49 238	2,223*	1,005*	123 415*	49 238	2,507*	1,005*
600	183 746	29 903	6,145	1,005	63 261	29 903	2,116	1,005	72 809	29 903	2,435	1,005
600	138 681	30 707	4,516	1,005	48 988	30 707	1,595	1,005	56 109	30 707	1,827	1,005
600	172 691	13 493	12,799	1,005	61 781	13 493	4,579	1,005	68 913	13 493	5,107	1,005
600	150 843	55 219	2,732	1,005	53 448	55 219	0,968	1,005	60 213	55 219	1,090	1,005
1200	351 336	58 605	5,995	1,005	122 119	58 605	2,084	1,005	140 132	58 605	2,391	1,000
Gjennomsnitt	167 240	41 603	5,774	1,004	58 715	41 603	2,038	1,004	66 891	41 603	2,307	1,003
Standardavvik	21 883	20 770	4,181	0,002	7 192	20 770	1,502	0,002	8 523	20 770	1,665	0,003
RSD	0,131	0,499	0,724	0,002	0,122	0,499	0,737	0,002	0,127	0,499	0,722	0,003
RSD %	13,1	49,9	72,4	0,2	12,2	49,9	73,7	0,2	12,7	49,9	72,2	0,3

*Prøven er en uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 92 Verdier for linearitetsrekken til sulfadoxin beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	311 → 156		311 → 107.9		311 → 92	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	307	298	105	104	121	119
Standardavvik stigningstall	15,1	13,0	5,42	4,86	5,61	5,19
Skjæringspunkt	-3 647	-3 353	- 1 333	-1 298	-1 395	-1 188
Standardavvik skjæringspunkt	8 483	7 325	3 053	2 738	3 161	2 923
R ²	0,990	0,992	0,989	0,991	0,992	0,992
Standardavvik y	15 365	13 267	5 529	4 959	5 725	5 294
F-verdi	417	524	372	453	468	524
Frihetsgrader	4	4	4	4	4	4
ss reg	9,83*10 ¹¹	9,23*10 ¹⁰	1,14*10 ¹⁰	1,12*10 ¹⁰	1,53*10 ¹⁰	1,47*10 ¹⁰
ss res	9,44*10 ⁸	7,04*10 ⁸	1,22*10 ⁸	9,84*10 ⁷	1,31*10 ⁸	1,12*10 ⁸
Avvik på måleområdet	0,0490	0,0437	0,0518	0,0470	0,0462	0,0438
Nedre 95 % skjæringspunkt	-27 201	-23 690	-9 809	-8 901	-10 171	-9 304
Øvre 95 % skjæringspunkt	19 906	16 984	7 142	6 304	7 380	6 928

Tabell A 93 Areal for sulfadoxin sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering	
	311 → 156		311 → 107.9	
100	-*	-*	-*	-*
100	27 098	9 265	11 072	11 072
100	32 082	11 468	12 987	12 987
100	29 464	10 007	13 888	13 888
100	42 666*	18 995*	20 887*	20 887*
100	35 462	12 078	14 484	14 484

*Prøvene er tydelige avvik, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 94 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} , for S-prøvene til sulfadoxin ved 600 ng/mL.

	311 → 156		311 → 107.9		311 → 92	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	631 012		211 939		244 396	
Spiket ekstrakt	146 434		50 996		58 305	
600	199 983	31,7	68 232	32,2	78 457	32,1
600	149 028	23,6	51 586	24,3	58 486	23,9
600	163 787	26,0	56 807	26,8	64 227	26,3
600	180 680	28,6	61 869	29,2	71 590	29,3
600	182 900	29,0	62 763	29,6	73 048	29,9
	R^T gjennomsnitt	27,8	Gjennomsnitt	28,4	Gjennomsnitt	28,3
	Standardavvik	3,1	Standardavvik	3,0	Standardavvik	3,2
	RSD %	11,1	RSD %	10,5	RSD %	11,3
	Max	31,7	Max	32,2	Max	32,1
	Min	23,6	Min	24,3	Min	23,9
Gjennomsnitt spike						
600	175 276		60 251		69 162	
R^{MS} , matrikseffekt	0,232	23,2	0,241	24,1	0,239	23,9
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	1,197	119,7	1,181	118,1	1,186	118,6

Tabell A 95 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til sulfadoxin ved 600 ng/mL.

	311 -> 156		311 → 107.9		311 → 92	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	543 658		191 268		212 669	
Spiket ekstrakt	126 944		45 681		51 248	
600	190 237	35,0	66 095	34,6	76 411	35,9
600	183 746	33,8	63 261	33,1	72 809	34,2
600	138 681	25,5	48 988	25,6	56 109	26,4
600	172 691	31,8	61 781	32,3	68 913	32,4
600	150 843	27,7	53 448	27,9	60 213	28,3
	R^T gjennomsnitt	30,8	Gjennomsnitt	30,7	Gjennomsnitt	31,5
	Standardavvik	4,0	Standardavvik	3,8	Standardavvik	4,0
	RSD %	13,1	RSD %	12,2	RSD %	12,7
	Max	35,0	Max	34,6	Max	35,9
	Min	25,5	Min	25,6	Min	26,4
Gjennomsnitt spike						
600	167 240		58 715		66 891	
R^{MS} , matrikseffekt	0,233	23,3	0,239	23,9	0,241	24,1
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	1,317	131,7	1,285	128,5	1,305	130,5

Tabell A 96 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfametoksazol sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnitt er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 254 → 156				Konfirmering 254 → 108				Konfirmering 254 → 92			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905				103 905		
25		63 407				63 407				63 407		
50	5 836	46 925	0,124	1,041	4 282	46 925	0,091	1,041	5 144	46 925	0,110	1,041
100	10 125	59 337	0,171	1,041	6 607	59 337	0,111	1,041	8 973	59 337	0,151	1,041
300	28 610	60 505	0,473	1,036	17 908	60 505	0,296	1,036	24 418	60 505	0,404	1,036
600	77 844	76 130	1,023	1,036	50 430	76 130	0,662	1,036	67 653	76 130	0,889	1,036
600	70 341	31 661	2,222	1,036	46 407	31 661	1,466	1,036	60 098	31 661	1,898	1,036
600	69 887	59 068	1,183	1,041	45 517	59 068	0,771	1,041	59 801	59 068	1,012	1,041
600	70 214	28 998	2,421	1,041	46 325	28 998	1,598	1,041	60 172	28 998	2,075	1,041
600	70 022	13 767	5,086	1,036	46 238	13 767	3,359	1,036	60 435	13 767	4,390	1,036
600	161 717*	53 553	3,020*	1,036*	104 668*	53 553	1,954*	1,036*	136 699*	53 553	2,553*	1,036*
1200	148 232	60 282	2,459	1,036	96 426	60 282	1,600	1,036	127 473	60 282	2,115	1,036
Gjennomsnitt	71 662	43 863	2,387	1,038	46 983	43 863	1,571	1,038	61 632	43 863	2,053	1,038
Standardavvik	3 460	22 986	1,630	0,003	1 959	22 986	1,081	0,003	3 373	22 986	1,407	0,003
RSD	0,048	0,524	0,683	0,003	0,042	0,524	0,688	0,003	0,055	0,524	0,686	0,003
RSD %	4,8	52,4	68,3	0,3	4,2	52,4	68,8	0,3	5,5	52,4	68,6	0,3

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 97 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for sulfametoksazol sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 254 → 156				Konfirmering 254 → 108				Konfirmering 254 → 92			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006				103 006		1,036
25		65 515				65 515				65 515		1,036
50	6 428	47 825	0,134	1,036	3 573	47 825	0,075	1,036	5 047	47 825	0,106	1,036
100	10 151	60 633	0,167	1,036	6 670	60 633	0,110	1,036	9 039	60 633	0,149	1,036
300	27 825	59 786	0,465	1,036	17 903	59 786	0,299	1,036	23 709	59 786	0,397	1,036
600	75 630	71 057	1,064	1,036	48 017	71 057	0,676	1,036	64 989	71 057	0,915	1,036
600	149 796*	49 238	3,042*	1,041*	97 163*	49 238	1,973*	1,041	127 930*	49 238	2,598*	1,041*
600	72 136	29 903	2,412	1,041	46 555	29 903	1,557	1,041	62 422	29 903	2,087	1,041
600	65 032	30 707	2,118	1,041	44 090	30 707	1,436	1,041	56 235	30 707	1,831	1,041
600	67 706	13 493	5,018	1,041	43 869	13 493	3,251	1,041	58 352	13 493	4,325	1,041
600	64 879	55 219	1,175	1,041	42 395	55 219	0,768	1,041	56 027	55 219	1,015	1,041
1200	147 388	58 605	2,515	1,036	95 844	58 605	1,635	1,041	126 652	58 605	2,161	1,041
Gjennomsnitt	69 077	41 603	2,357	1,038	44 985	41 603	1,537	1,039	59 605	41 603	2,035	1,039
Standardavvik	4 695	20 770	1,598	0,003	2 259	20 770	1,035	0,003	3 958	20 770	1,377	0,003
RSD	0,068	0,499	0,678	0,003	0,050	0,499	0,673	0,003	0,066	0,499	0,677	0,003
RSD %	6,8	49,9	67,8	0,3	5,0	49,9	67,3	0,3	6,6	49,9	67,7	0,3

* Prøven er en uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 98 Verdier for linearitetsrekken til sulfametoksazol beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	254 → 156		254 → 108		254 → 92	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	127	125	82	82	109	108
Standardavvik stigningstall	5,17	5,0	3,7	3,0	4,8	4,4
Skjæringspunkt	-2844	-2 936	-1 867	-2 325	-2 258	-2 561
Standardavvik skjæringspunkt	3187	3 113	2 298	1 852	2 964	2 687
R ²	0,995	0,995	0,994	0,996	0,994	0,995
Standardavvik y	4 874	4 761	3 515	2 832	4 534	4 108
F-verdi	600	617	467	739	513	613
Frihetsgrader	3	3	3	3	3	3
ss reg	1,43*10 ¹⁰	1,40*10 ¹⁰	6,02*10 ¹⁰	5,93*10 ¹⁰	1,05*10 ¹⁰	1,04*10 ¹⁰
ss res	7,73*10 ⁷	6,80*10 ⁷	3,71*10 ⁷	2,41*10 ⁷	6,17*10 ⁷	5,07*10 ⁷
Avvik på måleområdet	0,0408	0,0403	0,0453	0,0358	0,0441	0,0404
Nedre 95 % skjæringspunkt	-23 987	-12 843	-9 181	-8 217	-11 692	-11 203
Øvre 95 % skjæringspunkt	7 299	6 971	5 447	3 568	7 176	5 901

Tabell A 99 Areal for sulfametoksazol sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering		Konfirmering	
	254 → 156		254 → 108		254 → 92	
100	5 298*		2 250*		5 004*	
100	11 662		7 245		9 262	
100	9 426		5 967		8 231	
100	10 789		6 420		8 223	
100	18 999*		12 968*		14 861*	
100	12 994		7 898		10 124	

* Prøvene er tydelige uteliggere, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 100 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til sulfametoksazol ved 600 ng/mL.

	254 → 156		254 → 108		254 → 92	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	235 912		149 526		199 878	
Spiket ekstrakt	72 340		47 503		63 318	
600	77 844	33,0	50 430	33,7	67 653	33,8
600	70 341	29,8	46 407	31,0	60 098	30,1
600	69 887	29,6	45 517	30,4	59 801	29,9
600	70 214	29,8	46 325	31,0	60 172	30,1
600	70 022	29,7	46 238	30,9	60 435	30,2
	R^T Gjennomsnitt	30,4	Gjennomsnitt	31,4	Gjennomsnitt	30,8
	Standardavvik	1,5	Standardavvik	1,3	Standardavvik	1,7
	RSD %	4,8	RSD %	4,2	RSD %	5,5
	Max	33,0	Max	33,7	Max	33,8
	Min	29,6	Min	30,4	Min	29,9
Gjennomsnitt spike 600	71 662		46 983		61 632	
R^{MS}, matrikseffekt	0,307	30,7	0,318	31,8	0,317	31,7
R^{PO}, i						
prøveopparbeidelsen	0,991	99,1	0,989	98,9	0,973	97,3

Tabell A 101 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til sulfametoksazol ved 600 ng/mL.

	254 → 156		254 → 108		254 → 92	
	% gjenfinning		% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind						
Ren standard	209 197		134 133		176 903	
Spiket ekstrakt	61 023		41 159		54 495	
600	75 630	36,2	48 017	35,8	64 989	36,7
600	72 136	34,5	46 555	34,7	62 422	35,3
600	65 032	31,1	44 090	32,9	56 235	31,8
600	67 706	32,4	43 869	32,7	58 352	33,0
600	64 879	31,0	42 395	31,6	56 027	31,7
	R^T gjennomsnitt	33,0	Gjennomsnitt	33,5	Gjennomsnitt	33,7
	Standardavvik	2,2	Standardavvik	1,7	Standardavvik	2,2
	RSD %	6,8	RSD %	5,0	RSD %	6,6
	Max	36,2	Max	35,8	Max	36,7
	Min	31,0	Min	31,6	Min	31,7
Gjennomsnitt spike						
600	69 077		44 985		59 605	
R^{MS} , matrikseffekt	0,292	29,2	0,307	30,7	0,308	30,8
R^{PO} , i						
prøveopparbeidelsen	1,132	113,2	1,093	109,3	1,094	109,4

Tabell A 102 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for trimetoprim sine S-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 291.5 → 123.2				Konfirmering 291.5 → 261.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 905				103 905		0,739
25		63 407				63 407		0,742
50	6 977	46 925	0,149	0,742	8 261	46 925	0,176	0,742
100	16 637	59 337	0,280	0,742	17 641	59 337	0,297	0,742
300	62 992	60 505	1,041	0,739	61 202	60 505	1,012	0,739
600	152 566	76 130	2,004	0,739	134 966	76 130	1,773	0,739
600	128 331	31 661	4,053	0,739	117 230	31 661	3,703	0,739
600	118 694	59 068	2,009	0,742	100 462	59 068	1,701	0,742
600	122 380	28 998	4,220	0,742	119 924	28 998	4,136	0,742
600	131 056	13 767	9,520	0,739	115 133	13 767	8,363	0,739
600	266 762*	53 553	4,234*	0,739*	257 161*	53 553	4,802*	0,739*
1200	307 479	60 282	5,101	0,739	299 207	60 282	4,963	0,739
Gjennomsnitt	130 605	43 863	4,361	0,740	117 543	43 863	3,935	0,740
Standardavvik	13 202	22 986	3,075	0,002	12 318	22 986	2,710	0,002
RSD	0,101	0,524	0,705	0,003	0,105	0,524	0,689	0,003
RSD %	10,1	52,4	70,5	0,3	10,5	52,4	68,9	0,3

* Prøven er en tydelig uteligger, og er dermed valgt vekk videre.

Tabell A 103 Rådata for linearitetsrekke og kontrollprøver ved 600 ng/mL for trimetoprim sine M-prøver. RT står for retensjonstid, hvor analyttens retensjonstid er relativ til internstandardens retensjonstid. Areal står for legemiddelets areal, og IS areal for internstandardens areal. Gjennomsnittet er beregnet for kontrollprøvene ved 600 ng/mL. For relativ RT er gjennomsnittet beregnet for alle prøvene.

Prøve	Kvantifisering 291.5 → 123.2				Konfirmering 291.5 → 261.1			
	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT	Areal	IS areal	Areal/IS	Relativ RT
0		103 006				103 006		
25		65 515			2 392	65 515	0,037	0,739
50	7 249	47 825	0,152	0,739	8 536	47 825	0,178	0,739
100	16 850	60 633	0,278	0,739	18 171	60 633	0,300	0,739
300	46 370	59 786	0,776	0,739	46 641	59 786	0,780	0,739
600	115 626	71 057	1,627	0,739	110 686	71 057	1,558	0,739
600	217 267*	49 238	4,413	0,739*	202 529*	49 238	4,113	0,739*
600	119 142	29 903	3,984	0,739	109 959	29 903	3,677	0,739
600	103 009	30 707	3,355	0,739	98 635	30 707	3,212	0,739
600	117 246	13 493	8,689	0,739	108 637	13 493	8,051	0,739
600	108 465	55 219	1,964	0,739	100 484	55 219	1,820	0,739
1200	214 889	58 605	3,667	0,739	200 651	58 605	3,424	0,739
Gjennomsnitt	112 698	41 603	3,924	0,739	105 680	41 603	3,664	0,739
Standardavvik	6 756	20 770	2,835	0,000	5 673	20 770	2,612	0,000
RSD	0,060	0,499	0,723	0,000	0,054	0,499	0,713	0,000
RSD %	6,0	49,9	72,3	0,0	5,4	49,9	71,3	0,0

* Prøven er en tydelig uteligger, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 104 Verdier for linearitetsrekken til trimetoprim beregnet med Excel sin LINEST-funksjon.

	Kvantifisering		Konfirmering	
	291.5 → 123.2		291.5 → 261.1	
	S-prøve	M-prøve	S-prøve	M-prøve
Stigningstall	265	183	254	170
Standardavvik stigningstall	5,1	6,5	7,1	5,2
Skjæringspunkt	-9 708	-2 096	-10 010	115
Standardavvik skjæringspunkt	3 136	3 985	4 396	2 901
R ²	0,999	0,996	0,998	0,996
Standardavvik y	3 136	6 094	6 723	5 254
F-verdi	2 708	801	1 270	1 087
Frihetsgrader	3	3	3	4
ss reg	6,23*10 ¹⁰	2,98*10 ¹⁰	5,74*10 ¹⁰	3,00*10 ¹⁰
ss res	6,90*10 ⁷	1,11*10 ⁸	1,36*10 ⁸	1,10*10 ⁸
Avvik på måleområdet	0,0192	0,0353	0,0281	0,0303
Nedre 95 % skjæringspunkt	-19 690	-14 778	-24 000	-7 939
Øvre 95 % skjæringspunkt	273	10 585	3 980	8 169

Tabell A 105 Areal for trimetoprim sine S-prøver ved 100 ng/mL

Konsentrasjon ng/mL	Kvantifisering		Konfirmering	
	291.5 → 123.2		291.5 → 261.1	
100	9 272*		8 826*	
100	17 986		19 272	
100	14 992		15 062	
100	15 768		15 290	
100	27 886*		25 962*	
100	21 962		21 062	

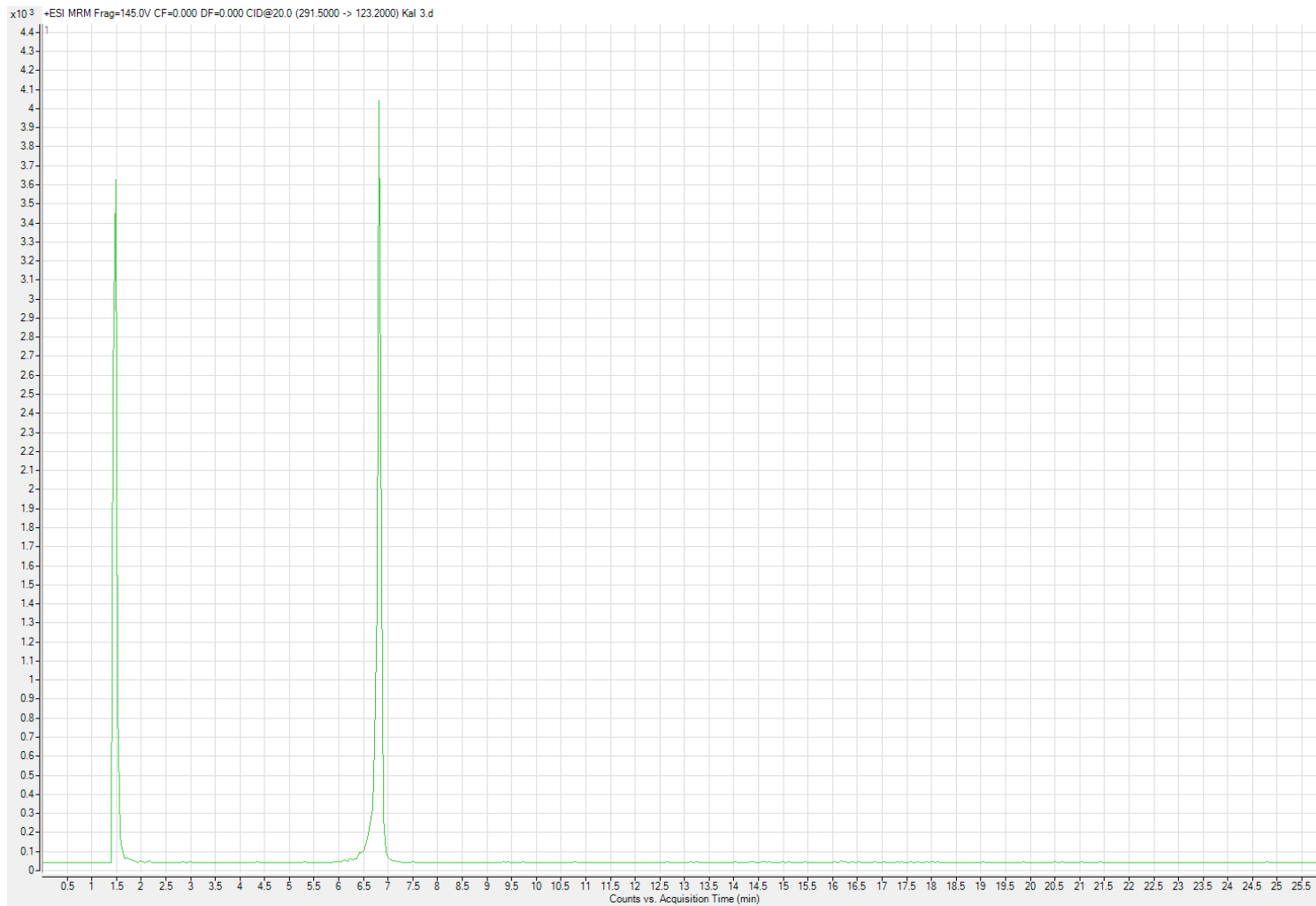
* Prøvene er tydelige uteliggere, og er derfor valgt vekk videre.

Tabell A 106 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for S-prøvene til trimetoprim ved 600 ng/mL.

	291.5 → 123.2		291.5 → 261.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blin				
Ren standard	126 884		125 799	
Spiket ekstrakt	189 202		170 003	
600	152 566	120,2	134 966	107,3
600	128 331	101,1	117 230	93,2
600	118 694	93,5	100 462	79,9
600	122 380	96,4	119 924	95,3
600	131 056	103,3	115 133	91,5
	R^T gjennomsnitt	102,9	Gjennomsnitt	93,4
	Standardavvik	10,4	Standardavvik	9,8
	RSD %	10,1	RSD %	10,5
	Max	120,2	Max	107,3
	Min	93,5	Min	79,9
Gjennomsnitt spike 600	130 605		117 543	
R^{MS}, matrikseffekt	1,491	149,1	1,351	135,1
R^{PO}, i				
prøveopparbeidelsen	0,690	69,0	0,691	69,1

Tabell A 107 Rådata og beregninger for R^T , og R^{PO} og R^{MS} for M-prøvene til trimetoprim ved 600 ng/mL.

	291.5 → 123.2		291.5 → 261.1	
	% gjenfinning		% gjenfinning	
Blind				
Ren standard	138 709		127 404	
Spiket ekstrakt	193 959		152 587	
600	115 626	91,1	110 686	87,2
600	119 142	93,9	109 959	86,7
600	103 009	81,2	98 635	77,7
600	117 246	92,4	108 637	85,6
600	108 465	85,5	100 484	79,2
	R^T gjennomsnitt	88,8	Gjennomsnitt	83,3
	Standardavvik	5,3	Standardavvik	4,5
	RSD %	6,0	RSD %	5,4
	Max	93,9	Max	87,2
	Min	81,2	Min	77,7
Gjennomsnitt spike				
600	112 698		105 680	
R^{MS} , matrikseffekt	1,398	139,8	1,198	119,8
R^{PO} , i				
prøveopparbeidelsen	0,581	58,1	0,693	69,3



Figur A 5 Trimetoprim sin kvantifiseringstopp i ren standard ved konsentrasjon 300 ng/mL. Toppen ved 1,5 minutter er av ukjent opprinnelse.

Tabell A 108 Deteksjonsgrensen, LOD, og kvantifiseringsgrensen, LOQ for 14 av de 15 ulike legemidlene, samt sulfadoxin.

			LOD	LOQ
			ng/mL	ng/mL
Amlodipin	409.2 →	S-prøve	6	19
	238.1	M-prøve	3	10
	409.2 →	S-prøve	3	10
	294.1	M-prøve	0*	0*
	409.2 →	S-prøve	8	25
	377.1	M-prøve	12	41
Benzylpenicillin	335 → 217	S-prøve	0*	0*
		M-prøve	15	49
Ciprofloksacin	332 →	S-prøve	21	70
	314.2	M-prøve	14	46
	332 →	S-prøve	27	90
	231.1	M-prøve	24	79
	332 →	S-prøve	29	98
	288.2	M-prøve	20	68
Ibuprofen	207 → 161	S-prøve	21	70
		M-prøve	0*	0*
Ketoprofen	255 → 209	S-prøve	8	28
		M-prøve	9	30
	255 → 105	S-prøve	8	27
		M-prøve	10	34
Losartan	423.2	S-prøve	14	47
	→207.2	M-prøve	0*	0*
	423.2 →	S-prøve	0*	0*
	377.1	M-prøve	0*	0*
Prednisolon	361.4 →	S-prøve	13	42
	343.2	M-prøve	15	50
	361.4 →	S-prøve	15	48
	171	M-prøve	30	99
	361.4 →	S-prøve	26	88
	147	M-prøve	19	65
Simvastatin	419.3 →	S-prøve	29	98
	285.2	M-prøve	21	69
	419.3 →	S-prøve	28	92
	199.2	M-prøve	28	93
Sulfadoxin	311 → 156	S-prøve	4	13
		M-prøve	5	15
	311 →	S-prøve	5	17
	107.9	M-prøve	5	16
	311 → 92	S-prøve	4	15
		M-prøve	4	13
Sulfametoksazol	254 → 156	S-prøve	9	31
		M-prøve	8	28
	254 → 108	S-prøve	10	34
		M-prøve	10	33
	254 → 92	S-prøve	7	24
		M-prøve	9	31
Trimetoprim	291.5 →	S-prøve	12	39,6
	123.2	M-prøve	13	43
	291.5 →	S-prøve	14	45
	261.1	M-prøve	3	8

* Det ble ikke analysert noen prøver i matriks med en konsentrasjon <25 ng/mL, og LOD/LOQ kan dermed kun estimeres i tilfellene hvor den er lavere enn 25 ng/mL. Det er ikke reelt å forvente en LOD/LOQ på 0 ng/mL, og i tilfeller hvor dette ble estimert ble det operert med en av de andre LOD/LOQ verdiene beregnet for legemiddelet.

Tabell A 109 Gjennomsnittlige verdier for responsfaktortesten til legemidlenes ulike ioner.

			Gjennomsnitt	STD	RSD %
Amlodipin	409.2 → 238.1	S-prøve[10]	224	28,1	12,5
		M-prøve[10]	200	46,5	23,2
	409.2 → 294.1	S-prøve[10]	168	24,6	14,6
		M-prøve[10]	150	38,4	25,7
	409.2 → 377.1	S-prøve[9]	20	5,0	25
M-prøve[10]	15	5,0	33		
Benzylpenicillin	335 → 217	S-prøve[9]	26	8,5	32
		M-prøve[9]	27	11	41
Ciprofloksacin	332 → 314.2	S-prøve[8]	67	19	29
		M-prøve[9]	34	6,1	18
	332 → 231.1	S-prøve[8]	44	9,7	22
		M-prøve[8]	22,	4,0	18
	332 → 288.2	S-prøve[8]	33	7,2	22
M-prøve[8]	21	3,8	18		
Ibuprofen	207 → 161	S-prøve[8]	13	1,0	7,8
		M-prøve[8]	11	2,9	27
Ketoprofen	255 → 209	S-prøve [9]	267	21,4	8,03
		M-prøve[9]	248	17,2	6,94
	255 → 105	S-prøve [9]	215	17,5	8,17
		M-prøve[9]	194	12,6	6,47
Losartan	423.2 → 207.2	S-prøve[9]	568	212	37,3
		M-prøve[9]	352	252	71,4
	423.2 → 377.1	S-prøve[9]	209	239	114
		M-prøve[9]	113	78,0	69,2
Prednisolon	361.4 → 343.2	S-prøve [9]	96	25	26
		M-prøve [10]	75	26	35
	361.4 → 147	S-prøve [9]	28	5,5	20
		M-prøve[9]	28	5,3	19
	361.4 → 171	S-prøve [8]	12	2,7	23
M-prøve[8]	11	2,5	24		
Simvastatin	419.3 → 285.2	S-prøve[8]	70	32	45
		M-prøve[8]	60	25	42
	419.3 → 199.2	S-prøve[8]	65	29	45
		M-prøve[8]	49	24	49
Sulfadoxin	311 → 156	S-prøve[10]	285	35,6	12,5
		M-prøve[10]	276	35,6	12,9
	311 → 107.9	S-prøve[10]	98	13	13
		M-prøve[10]	97	13	14
	311 → 92	S-prøve[10]	113	14,0	12,5
M-prøve[10]	111	14,9	13,4		
Sulfametoksazol	254 → 156	S-prøve[9]	115	10,5	9,14
		M-prøve[9]	114	12,0	10,5
	254 → 108	S-prøve[9]	75,9	8,3	11
		M-prøve[9]	73	6,5	9,0
	254 → 92	S-prøve[9]	99	9,1	9,1
M-prøve[9]	97	9,1	9,3		
Trimetoprim	291.5 → 123.2	S-prøve[9]	207	37,3	18,1
		M-prøve[9]	176	18,3	10,4
	291.5 → 261.1	S-prøve[9]	197	27,2	13,8
		M-prøve[10]	165	26,2	15,9

Tabell A 110 Den relative ioneintensiteten til 8 av de 15 utvalgte legemidlene, samt sulfadoxin.

			Gjennomsnitt	STD	RSD %
Amlodipin	238.1/294.1	S-prøve[10]	0,749	0,0523	6,97
		M-prøve[10]	0,744	0,0680	9,14
	238.1/377.1	S-prøve[9]	0,089	0,020	23
		M-prøve[9]	0,078	0,016	21
Ciprofloksacin	314.2/231.1	S-prøve[9]	0,669	0,0826	12,4
		M-prøve[9]	0,664	0,0720	10,8
	314.2/288.2	S-prøve[9]	0,513	0,0747	14,5
		M-prøve[9]	0,648	0,0935	14,4
Ketoprofen	209/105	S-prøve[9]	0,804	0,0124	1,54
		M-prøve[9]	0,783	0,00881	1,13
Losartan	207.2/377.1	S-prøve[8]	0310	0,213	68,8
		M-prøve[8]	0,334	0,0532	16,0
Prednisolon	343.2/147	S-prøve [9]	0,295	0,0535	18,1
		M-prøve[8]	0,422	0,207	46,8
	343.2/171	S-prøve[8]	0,132	0,0166	12,6
		M-prøve[8]	0,162	0,0668	41,2
Simvastatin	285.2/199.2	S-prøve[8]	0,956	0,282	29,5
		M-prøve[8]	0,830	0,184	22,1
Sulfadoxin	156/107.9	S-prøve[10]	0,342	0,00650	1,90
		M-prøve[10]	0,349	0,00851	2,44
	156/92	S-prøve[10]	0,396	0,00339	0,856
		M-prøve[10]	0,402	0,0102	2,53
Sulfametoksazol	156/108	S-prøve[9]	0,660	0,0295	4,47
		M-prøve[9]	0,641	0,0339	5,30
	156/92	S-prøve[9]	0,864	0,0120	1,39
		M-prøve[9]	0,856	0,0285	3,33
Trimetoprim	123.2/261.1	S-prøve[9]	0,966	0,105	10,9
		M-prøve[9]	0,987	0,0874	8,85

Tabell A 111 Gjennomsnitt av areal for 600 ng/mL og 100 ng/mL kontrollprøvene. S-prøvene er forkortet S. M-prøvene er forkortet M.

				Gjennomsnitt	STD	RSD %
Amlodipin	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	145 142	6 797	4,7
	238.1		M[6]	111 921	33 836	30,2
		100 ng/mL	S[4]	23 298	3 621	15,5
	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	111 968	8 443	7,5
	294.1		M[6]	88 271	32 253	36,5
		100 ng/mL	S[4]	15 809	2 510	15,9
Benzylpenicillin	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	11 705	3 705	31,7
	377.1		M[6]	8 303	3 702	44,6
		100 ng/mL	S[4]	2 088	684	32,8
	335 →	600 ng/mL	S[6]	15 019	4 526	30,1
	217		M[6]	18 633	6 633	35,6
		100 ng/mL	S[4]	3 892	1 309	33,6
Ciprofloksacin	332 →	600 ng/mL	S[5]	33 727	7 123	21,1
	314.2		M[5]	18 472	3 192	17,3
		100 ng/mL	S[4]	9 117	1 160	12,7
	332 →	600 ng/mL	S[5]	24 020	4 355	18,1
	231.1		M[5]	12 989	2 158	16,6
		100 ng/mL	S[4]	4 875	513	10,5
Ibuprofen	332 →	600 ng/mL	S[5]	18 043	2 214	12,3
	288.2		M[5]	12 881	2 087	16,2
		100 ng/mL	S[4]	4 520	475	10,5
	207 →	600 ng/mL	S[5]	8 155	683	8,4
	161		M[6]	6 444	1 785	27,7
		100 ng/mL	S[4]	1 364	398	28,5
Ketoprofen	255 →	600 ng/mL	S[5]	165 619	5 838	3,5
	209		M[5]	151 592	4 201	2,8
		100 ng/mL	S[4]	25 554	2 942	11,5
	255 →	600 ng/mL	S[5]	132 577	4 195	3,2
	105		M[5]	118 898	3 384	2,8
		100 ng/mL	S[4]	20 156	2 589	12,8
Losartan	423.2 →	600 ng/mL	S[5]	289 295	24 391	8,4
	207.2		M[5]	142 536	7 907	5,5
		100 ng/mL	S[4]	60 117	4 463	7,4
	423.2 →	600 ng/mL	S[5]	58 141	8 148	14,0
	377.1		M[5]	47 948	7 480	15,6
		100 ng/mL	S[4]	40 754	3 973	9,8
Prednisolon	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	55 092	7 431	13,5
	343.2		M[5]	36 305	11 145	30,7
		100 ng/mL	S[4]	10 735	2 025	18,9
	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	18 078	2 912	16,1
	147		M[5]	17 510	2 272	13,0
		100 ng/mL	S[4]	3 314	662	20,0
Simvastatin	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	7 443	1 498	20,1
	171		M[5]	6 156	1 831	29,7
		100 ng/mL	S[4]	1 052	256	24,3
	419.3 →	600 ng/mL	S[5]	44 966	21 356	47,5
	285.2		M[5]	34 296	17 470	50,9
		100 ng/mL	S[4]	6 162	1 320	21,4
Simvastatin	419.3 →	600 ng/mL	S[5]	44 573	17 251	38,7
	199.2		M[5]	30 649	15 495	50,6
		100 ng/mL	S[4]	4 095	1 191	29,1

				Gjennomsnitt	STD	RSD %
Sulfadoxin	311 →	600 ng/mL	S[5]	175 276	19 485	11,1
	156		M[5]	167 240	21 883	13,1
		100 ng/mL	S[4]	31 027	3 590	11,6
	311 →	600 ng/mL	S[5]	60 251	6 316	10,5
	107.9		M[5]	58 715	7 192	12,2
		100 ng/mL	S[4]	10 705	1 295	12,1
	311 → 92	600 ng/mL	S[5]	69 162	7 838	11,3
			M[5]	66 891	8 523	12,7
	100 ng/mL	S[4]	13 108	1 490	11,4	
Sulfametoksazol	254 →	600 ng/mL	S[5]	71 662	3 360	4,8
	156		M[5]	69 077	4 695	6,8
		100 ng/mL	S[4]	11 218	1 500	13,4
	254 →	600 ng/mL	S[5]	46 983	1 959	4,2
	108		M[5]	44 985	2 259	5,0
		100 ng/mL	S[4]	6 883	859	12,4
	254 → 92	600 ng/mL	S[5]	61 632	3 373	5,5
			M[5]	59 605	3 958	6,6
	100 ng/mL	S[4]	8 960	917	10,2	
Trimetoprim	291.5 →	600 ng/mL	S[5]	130 605	13 202	10,1
	123.2		M[5]	112 698	6 756	6,0
		100 ng/mL	S[4]	17 677	3 126	17,7
	291.5 →	600 ng/mL	S[5]	117 543	12 318	10,5
	261.1		M[5]	105 680	5 673	5,4
		100 ng/mL	S[4]	17 672	2 974	16,8

Tabell A 112 Estimert konsentrasjon for kontrollprøver ved 600 ng/mL og 100 ng/mL

				Estimert konsentrasjon i ng/mL	Avvik i %
Amlodipin	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	673	12,1
	238.1		M[6]	519	13,5
		100 ng/mL	S[4]	110	9,66
	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	710	18,4
	294.1		M[6]	568	5,33
		100 ng/mL	S[4]	98	1,75
Benzylpenicillin	409.2 →	600 ng/mL	S[5]	572	4,65
	377.1		M[6]	482	19,8
		100 ng/mL	S[4]	90	9,67
	335 →	600 ng/mL	S[6]	650	8,39
	217		M[6]	1 374	129
		100 ng/mL	S[4]	199	99,0
Ciprofloksacin	332 →	600 ng/mL	S[5]	414	31,0
	314.2		M[6]	498	16,9
		100 ng/mL	S[4]	153	52,8
	332 →	600 ng/mL	S[5]	447	25,5
	231.1		M[6]	540	9,96
		100 ng/mL	S[4]	155	54,9
Ketoprofen	332 →	600 ng/mL	S[5]	454	24,4
	288.2		M[6]	548	8,74
		100 ng/mL	S[4]	180	79,6
	255 →	600 ng/mL	S[5]	617	2,87
	209		M[5]	602	0,27
		100 ng/mL	S[4]	107	6,59
Prednisolon	255 →	600 ng/mL	S[5]	611	1,69
	105		M[5]	600	0,03
		100 ng/mL	S[4]	106	5,88
	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	615	2,48
	343.2		M[5]	410	31,7
		100 ng/mL	S[4]	129	29,4
Sulfadoxin	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	656	9,26
	147		M[5]	615	2,52
		100 ng/mL	S[4]	141	41,2
	361.4 →	600 ng/mL	S[5]	584	2,61
	171		M[5]	517	13,9
		100 ng/mL	S[4]	142	42,3
Sulfametoksazol	311 →	600 ng/mL	S[5]	582	3,00
	156		M[5]	573	4,53
		100 ng/mL	S[4]	113	12,8
	311 →	600 ng/mL	S[5]	593	1,10
	107.9		M[5]	580	3,39
		100 ng/mL	S[4]	115	15,1
Sulfametoksazol	311 → 92	600 ng/mL	S[5]	586	2,27
			M[5]	573	4,51
		100 ng/mL	S[4]	119	19,5
	254 →	600 ng/mL	S[5]	588	1,92
	156		M[5]	574	4,38
		100 ng/mL	S[4]	111	11,1
Sulfametoksazol	254 →	600 ng/mL	S[5]	575	4,21
	108		M[5]	578	3,59
		100 ng/mL	S[4]	106	6,42
	254 → 92	600 ng/mL	S[5]	568	5,34
			M[5]	576	3,96
		100 ng/mL	S[4]	103	3,04

				Estimert konsentrasjon i ng/mL	Avvik i %
Trimetoprim	291.5	600 ng/mL	S[5]	530	11,6
	→123.2		M[5]	628	4,62
		100 ng/mL	S[4]	104	3,52
	291.5 →	600 ng/mL	S[5]	502	16,3
	261.1		M[5]	622	3,59
	100 ng/mL	S[4}	109	9,01	

Tabell A 113 Total gjenfinning, R^T , matrikseffekt, R^{MS} og gjenfinning i prøveopparbeidelsen, R^{PO} , for 14 av de 15 ulike legemidlene, samt sulfadoxin.

			R^T	R^{MS}	R^{PO}
Amlodipin	409.2 →	S-prøve[5]	33,6 ± 1,6	54,7	61,4
	238.1	M-prøve[6]	27,0 ± 8,2	24,0	112,7
	409.2 →	S-prøve[5]	37,3 ± 2,8	64,7	57,7
	294.1	M-prøve[6]	30,6 ± 11,2	27,3	112,1
	409.2 →	S-prøve[5]	28,8 ± 9,1	54,9	52,3
	377.1	M-prøve[6]	22,9 ± 10,2	21,6	105,9
Benzylpenicillin	335 →	S-prøve[5]	42,6 ± 12,9	131,4	32,5
	217	M-prøve[5]	52,9 ± 18,8	121,9	43,4
Ciprofloksacin	332 →	S-prøve[5]	33,7 ± 7,1	187,9	17,9
	314.2	M-prøve[6]	19,0 ± 3,3	157,7	12,0
	332 →	S-prøve[5]	33,9 ± 6,1	177,9	19,0
	231.1	M-prøve[6]	19,4 ± 3,2	155,2	12,5
	332 →	S-prøve[5]	24,7 ± 3,0	133,1	18,6
	288.2	M-prøve[6]	17,8 ± 2,9	118,0	15,1
Ibuprofen	207 →	S-prøve [5]	68,1 ± 5,7	80,5	84,5
	161	M-prøve[5]	53,8 ± 14,9	72,2	74,6
Ketoprofen	255 → 209	S-prøve[5]	48,6 ± 1,7	47,0	103,3
		M-prøve[5]	48,1 ± 1,3	44,1	109,1
	255 →	S-prøve[5]	48,3 ± 1,5	46,0	105,0
	105	M-prøve[5]	49,4 ± 1,4	45,3	109,2
Losartan	423.2 →	S-prøve[5]	50,4 ± 4,2	18,7	268,9
	207.2	M-prøve[5]	24,8 ± 1,4	24,5	101,5
	423.2 →	S-prøve[5]	47,1 ± 6,6	38,4	122,9
	377.1	M-prøve[5]	38,9 ± 6,1	113,3	34,3
Prednisolon	361.4 →	S-prøve[5]	25,9 ± 3,5	18,0	144,4
	343.2	M-prøve[5]	17,9 ± 5,5	31,0	57,6
	361.4 →	S-prøve[5]	23,5 ± 3,8	14,1	166,4
	147	M-prøve[5]	23,8 ± 3,1	27,7	85,7
	361.4 →	S-prøve[5]	22,8 ± 4,6	13,9	164,2
171	M-prøve[5]	19,8 ± 5,9	30,2	65,7	
Simvastatin	419.3 →	S-prøve[5]	46,6 ± 22,1	52,9	88,1
	285.2	M-prøve[5]	26,1 ± 13,3	72,4	36,1
	419.3 →	S-prøve[5]	53,9 ± 20,9	56,8	94,9
	199.2	M-prøve[5]	26,8 ± 13,5	73,7	36,4
Sulfadoxin	311 →	S-prøve[5]	27,8 ± 3,1	23,2	119,7
	156	M-prøve[5]	30,8 ± 4,0	23,4	131,7
	311 →	S-prøve[5]	28,4 ± 3,0	24,1	118,1
	107.9	M-prøve[5]	30,7 ± 3,8	23,9	128,5
	311 → 92	S-prøve[5]	28,3 ± 3,2	23,9	118,6
		M-prøve[5]	31,5 ± 4,0	24,1	130,5
Sulfametoksazol	254 →	S-prøve[5]	30,4 ± 1,5	30,7	99,1
	156	M-prøve[5]	33,0 ± 2,2	29,2	113,2
	254 →	S-prøve[5]	31,4 ± 1,3	31,8	98,9
	108	M-prøve[5]	33,5 ± 1,7	30,7	109,3
	254 → 92	S-prøve[5]	30,8 ± 1,7	31,7	97,3
		M-prøve[5]	33,7 ± 2,2	30,8	109,4

			R^T	R^{MS}	R^{PO}
Trimetoprim	291.5 →	S-prøve[5]	102,9 ± 10,4	149,1	69,0
	123.2	M-prøve[5]	88,8 ± 5,3	139,8	58,1
	291.5 →	S-prøve[5]	93,4 ± 9,8	135,1	69,1
	261.1	M-prøve[5]	83,3 ± 4,5	119,8	69,3

Innløpsvannprøver

Tabell A 114 Areal og S/N forhold for legemidlene detektert i innløpsvannprøvene, dag 1.

		S-prøve							M-prøve						
		Utløpsvann		Innløpsvann					Utløpsvann		Innløpsvann				
		Blind	25 ng/mL	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Blind	25 ng/mL	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve
Amlodipin	Areal	180	5 650	958	994	1 095	1 035	972	236	7 110	1 097	1 015	914	1 076	439
	S/N	3	184	21	26	46	17	24	5	71	27	24	21	40	7
Ibuprofen	Areal	482	863	3 575	3 102	3 662	3 527	8 621	366	363	4 604	4 239	4 200	4 612	4 001
	S/N	2	6	25	15	17	10	48	4	1	13	43	11	14	12
Ketoprofen	Areal	6 411	15 439	2 367	2 566	4 508	4 992	4 430	5 782	14 650	4 707	4 671	4 497	4 159	4 379
	S/N	44	86	6	7	18	31	13	51	81	19	26	19	17	25
Koffein	Areal	1 426	3 336	70 942	69 685	62 519	99 425	69 947	1 598	2 927	59 826	63 012	57 681	54 097	58 451
	S/N	10	18	3 391	2 111	2 948	3 242	4 816	18	18	3 355	3 181	2 831	2 548	2 927
Losartan	Areal	28 370	34 951	31 373	69 523	30 082	33 334	32 979	26 221	35 015	29 102	35 212	31 894	31 005	29 739
	S/N	164	258	354	1 143	181	323	285	218	338	298	289	318	222	195
Metoprolol	Areal	40 980	52 520	21 412	21 580	20 647	21 419	20 340	43 345	54 805	22 067	21 142	21 459	21 942	21 651
	S/N	451	770	277	308	296	260	299	788	458	173	425	458	362	785
Sulfametoksazol	Areal	4 959	8 592	6 005	6 026	5 952	6 258	6 011	4 992	9 289	5 860	6 092	6 234	6 311	6 278
	S/N	91	159	162	180	145	95	196	107	194	132	75	129	161	158
Trimetoprim	Areal	10 282	18 578	2 376	3 112	2 536	3 079	2 685	6 146	9 033	2 074	2 158	2 197	2 573	2 687
	S/N	113	174	16	25	16	24	28	116	65	17	28	21	39	42

Tabell A 115 Areal og S/N forhold for legemidlene detektert i innløpsvannprøvene, dag 2.

		S-prøve							M-prøve						
		Utløpsvann		Innløpsvann					Utløpsvann		Innløpsvann				
		Blind	25 ng/mL	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Blind	25 ng/mL	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve	Prøve
Amlodipin	Areal	476	4 982	892	639	895	923	646	394	3 954	894	711	776	873	584
	S/N	16	109	26	18	19	18	18	18	138	38	21	12	17	16
Ibuprofen	Areal	1 132	607	4 065	4 066	3 632	4 058	4 025	1 233	440	3 286	3 330	8 842	8 624	9 279
	S/N	11	3	23	13	66	26	23	13	4	24	22	176	109	89
Ketoprofen	Areal	5 747	13 287	3 782	4 787	4 596	4 643	4 723	5 060	11 967	2 453	2 124	1 792	1 868	2 074
	S/N	23	84	16	31	27	24	17	35	51	7	4	4	3	7
Koffein	Areal	4 012	5 989	68 860	66 690	68 213	64 608	72 097	3 477	5 167	67 233	65 688	67 871	69 112	73 112
	S/N	10	16	3 595	3 154	3 458	129	4 005	12	17	3 638	3 833	4 245	4 514	4 055
Losartan	Areal	27 123	33 348	28 598	30 686	30 897	31 427	28 196	26 596	32 256	74 358	23 895	30 267	75 310	72 952
	S/N	313	315	249	228	338	201	217	221	294	972	201	346	985	1 106
Metoprolol	Areal	42 212	51 248	20 071	20 292	20 719	20 754	21 048	42 848	50 176	20 141	20 491	19 619	18 889	18 639
	S/N	310	817	167	283	208	150	221	491	542	231	299	435	384	333
Sulfametoksazol	Areal	4 855	8 270	5 691	6 053	5 885	5 834	5 837	4 695	7 696	5 784	6 034	5 492	5 638	5 519
	S/N	69	182	153	187	213	160	137	119	119	181	116	116	145	154
Trimetoprim	Areal	7 050	13 753	3 375	2 739	2 891	2 777	2 522	6 454	8 156	2 863	2 543	3 575	2 616	2 671
	S/N	52	122	71	20	28	18	25	79	107	106	59	59	38	16

Standard operation procedure

1. ANALYSEPRINSIPP

1.1 Analyttene oppkonsentreres med SPE før de ekstraheres med en QuEChERS ekstraksjon. Prøvene analyseres med HPLC-MS/MS(ESI(+)-QqQ).

2. UTSTYR

2.1 Glass og engangsutstyr

- 50 mL sentrifugerør med kork, polypropylen.
- 12 mL konisk sentrifugerør med kork, glass, analytisk grad.
- 1,5 mL eppendorfrør, polypropylen.
- Spin-X sentrifugefilter, 0,22 μm , nylon, polypropylenrør.
- HPLC-prøveglass, polypropylen
- Pasteur pipetter med smokk
- Målekolber, glass, analytisk grad
- Buchner funnel, glass, analytisk grad.
- Vakuumbufferflaske, glass, analytisk grad.

2.2 Instrumenter

- Analytisk vekt
- Sentrifuge, 50mL
- Vortex
- Automatpipetter
- Neddemper
- Mikrosentrifuge, 2mL
- HPLC-MS/MS

2.3 Resterende utstyr

- Vakuumbufferflaske
- Oasis HLB 12cc Vac Cartridge, 500 mg sorbent per patron, 60 μm partikkelstørrelse, porestørrelse 80Å
- Whatman glassmikrofiberfilterpapir, GF/C grade, 1.2 μm porestørrelse.
- Large volume sampler adaptere

3. KJEMIKALIER OG REAGENSER

3.1 Kjemikalier og reagenser

- Metanol, HPLC-kvalitet, $\geq 99,8\%$
- Acetonitril, HPLC-kvalitet, 99,9 %
- Maursyre, $\geq 96\%$
- Eddiksyre, $\geq 99,8\%$
- Dimetylsulfoksid $> 99,5\%$
- Natriumsulfat, $\geq 99,0\%$
- Natriumklorid, 99,5 %
- PSA bounded Silica

3.2 Løsninger

- 0,1 % V/V maursyre i vann
- 0,1 % V/V maursyre i acetonitril
- Metanol / vann (1+1)
- 5 % V/V metanol i vann
- 1 % V/V eddiksyre i acetonitril
- 5 % V/V maursyre i acetonitril

3.3 Standarder

- Ketoprofen, 1 mg/mL i metanol, fra Fluka Analytical
- Sulfametoksazol, 1 mg/mL i metanol, fra Sigma Aldrich
- Sulfadoxin, 1 mg/mL i metanol, fra Fluka Analytical
- Trimetoprim, 1 mg/mL i metanol, fra Fluka Analytical

3.4 Standardløsninger

OBS!! Husk å ta hensyn til eventuelt salt ved innveiging

- 10 µg/mL standardløsninger ble laget ved å fortynne 0,100 mL av 1 mg/mL stamløsningene (se avsnitt 3.3), til 10 mL med metanol.
- 0,1 µg/mL standardløsninger lages ved å fortynne 0,100 mL av 10 µg/mL standardløsningen til 10 mL med metanol.

Holdbarhet og oppbevaring:

Både stamløsninger og standardløsninger oppbevares i kjøleskap ved 4 °C.

Stamløsningen til ketoprofen er holdbar i 8 måneder.

Stamløsningen til sulfametoksazol og sulfadoxin er holdbar i 3 måneder.

Stamløsningen til trimetoprim lages ny til hver uke.

Alle standardløsninger ble laget nye til hver dag.

Mobilfaser og andre løsninger som benyttes opparbeides nye hver uke. Lagres ved romtemperatur på 22°C.

4. PRØVEOPPARBEIDELSE

- Filtrer avløpsvannet. 1 filter per 500 mL for innløpsvann, 1 filter per 100 mL for utløpsvann.
- Kondisjonerer Oasis HLB kolonnene med 5 mL metanol. Ekvilibrer med 5 mL Milli-Q vann.
- Lag en kopling mellom flaskene med avløpsvann og Oasis HLB-kolonnen.
- Tilsett eventuelt standard i følge Tabell SOP 1
- Påfør 1 L avløpsvann med flow 1 - 2 mL/min.
- Vask kolonnen med 5 mL 5 % V/V metanol i vann
- Tørk kolonnen under høyt vakuum i 30 minutter.
- Eluer forbindelsene i 12 mL sentrifugerør med 10 mL metanol.
- Tilsett 50 µL DMSO
- Damp ned uten temperaturkontroll med trykkluft
- Residuet løses til 5 mL vann ved vortexmiksing i 30 sekunder.
- Overfør prøven til et 50 mL sentrifugerør.
- Tilsett 5 mL ACN med 1 % V/V eddiksyre. Rist kraftig i 1 minutt.
- Tilsett 0,5g NaCl og 2g Na₂SO₄. Rist hver prøve kraftig kort med en gang etter tilsetning for å hindre agglomerering av saltene.
- Rist kraftig i 1 minutt.
- Sentrifuger ved 1 509 g i 5 minutter.
- 1 delprøve fra den øvre fasen overføres til et sentrifugefilter.
- 1 delprøve á 1 mL overføres til et eppendorfrør inneholdende 25 mg PSA og 150 mg Na₂SO₄.
- Rist i 30 s.
- Sentrifuger ved 600 g i 5 minutter.
- Overfør 650 µL av væskefasen til et sentrifugefilter. Tilsett 6,5 µL 5 % V/V maursyre i ACN
- Filtrer begge delprøvene med et sentrifugefilter i 1 min ved 7 200 g.
- Prøvene overføres til HPLC-prøveglass.

4.2 Kalibreringskurve og kontrollprøver

- Kalibreringskurven lages ved å tilsette standard til utløpsvannmatriks i følge Tabell SOP 1.
- På grunn av svært stor påvirkning av matriks fra utløpsvannet, må en ny linearitetsrekke opparbeides ny til hver gang.

Tabell SOP 1 Mengde standard som tilsettes utløpsvannmatriks for å opparbeide kalibreringskurven

Spiket med i ng/mL	0	25	50	100	300	600	1200
Tilsatt µL fra 10 µg/mL standardløsning		12.5	25	50	150	300	600

5. ANALYSEBETINGELSER

5.1 HPLC-betingelser

Tabell SOP 2 HPLC-betingelser

Parameter	
Kolonne	Agilent Zorbax Eclipse Plus C ₁₈ RRHD, 2,1 x 100 mm, 1,8 µm
Forkolonne	Agilent UHPLC fast guard Eclipse Plus C ₁₈ , 2,1 x 5 mm, 1,8 µm
Mobilfase A	0,1 % maursyre i vann
Mobilfase B	0,1 % maursyre i acetonitril
Gjennomstrømningshastighet	0,225 µL/min
Injeksjonsvolum	5 µL
Autosamplertemperatur	4°C
Vaskeløsning	1 + 1 metanol/vann
Kolonnetemperatur	20 °C
Analysetid	26 min

5.2 Pumpeprogram HPLC

Tabell SOP 3 Pumpeprogram HPLC

Tid	Mobilfase A	Mobilfase B
Min	%	%
0	95	5
0,25	95	5
4	80	20
7,5	60	40
10	35	65
13	15	85
15	0	100
18	0	100
20	95	5
26	95	5

5.3 MS/MS-betingelser

Brukt metode: 151106 metodetest a 35 a trykk 600 bar

Ionekilde: Elektroprayionisering med positivt polaritet

Tabell SOP 4 Massespektrometerparametere for de ulike analyttene

Analytt	Retensjonstid min	Forløperion m/z	Produksjon m/z
Ketoprofen	12,34	255	<u>209</u> 105
Sulfadoxin	9,28	311	<u>156</u> 107,9 92
Sulfametoksazol	9,56	254	<u>156</u> 108 92
Trimetoprim	6,818	291.5	<u>123.2</u> 261.1

Fragmentionet understreket benyttes til kvantifisering.

5.4 Kvantifisering

Programvaren MassHunter Quantitative Analysis benyttes for bearbeiding og kvantifisering av resultatene. For å estimere konsentrasjonen av en analytt i en prøve, brukes regresjonslinjen fra en matriksbasert kalibreringskurve. Denne opparbeides ved å plote analyttens respons mot analyttens konsentrasjon.

6. BIDRAG TIL USIKKERHET

Tabell SOP 5 Faktorer som bidrar til metodens usikkerhet.

Handling	Bidrag til usikkerhet
Innveiling / utpipettering	**
Tilsetting av standard og internstandard	***
Homogenisering, ekstraksjon og sentrifugering	**
Overføring av prøve	**
Inndamping og tilsetting av sluttløsemiddel	***
Spin-x og overføring til HPLC-prøveglass	*
Ekvilibrering av HPLC-kolonne og ionekilde	*
Dødvolum i HPLC-oppsettet	**

* = lite bidrag til usikkerhet

** = middels bidrag til usikkerhet

*** = stort bidrag til usikkerhet



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

Postboks 5003
NO-1432 Ås
Norway