



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2021 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

## **Analyse av tryptaminer i fullblod med UHPLC-MS/MS**

Analysis of tryptamines in whole blood by UHPLC-  
MS/MS

Monica Kvitrud Eidhammer

Kjemi

## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved Avdelingen for rettsmedisinske fag ved Oslo universitetssykehus (OUS) i samarbeid med Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU), fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap. Oppgaven fant sted i perioden august 2020 til februar 2021 med veiledning fra Dag Ekeberg, Åse Marit Leere Øiestad, Elin Eliassen og Lena Kristoffersen.

Jeg vil først og fremst takke Dag og Åse Marit for at jeg fikk muligheten til å skrive denne oppgaven.

Tusen takk, Åse Marit og Lena for all deres tid og kunnskap dere har delt med meg. Jeg kan ikke få takket dere nok.

Takk til Elin for alt du har lært meg, og for hjelp med instrumenttrøbbel til sent på kveld.

Takk til Elisabeth Leere Øiestad for bl.a. tips til litteratur og for at du «reddet meg» en sein kveld.

Jeg vil takke Avdeling for rettsmedisinske fag ved OUS for at dere tok meg imot og for det gode, inkluderende miljøet dere har vist meg.

Til sist, takk til Anders for at du alltid heier på meg.

## Sammendrag

Tryptaminer er en undergruppe av nye psykoaktive substanser (NPS) med økende forekomst i senere år. I tillegg kan en fornyet interesse for medisinsk bruk av tryptaminer føre til økt bruk i samfunnet. Dette gjør det aktuelt med metoder for analyse av tryptaminer.

En Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS)-metode ble utviklet for separasjon og deteksjon av 21 tryptaminer. Kromatografisk separasjon av analyttene ble utført ved omvendtfasekromatografi i bifenyl-kolonne (2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm partikler) med kolonnetemperatur på 60 °C, mobilfase (MF)-hastighet på 0,5 mL/min, injiseringsvolum 1,5 µL og gradient eluering på 7,5 min med 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 og metanol som organisk løsemiddel. Deteksjon ble utført med elektroprayonisering (ESI) i positiv modus og med multiple reaction monitoring (MRM)-skannmodus. Metoden ble brukt til å studere stabilitet av analyttene i fullblod og i stamløsninger i organiske løsningsmidler. For prøveopparbeidelse av tryptaminer i fullblod ble proteinutfelling (PPT) med acetonitril: metanol (85:15, v/v) benyttet. Stabilitetsprøver av tryptaminer i fullblod/organiske løsningsmidler oppbevart i romtemperatur, kjøleskap og fryser ble analysert med UHPLC-MS/MS.

Gradienten førte til separasjon av 13 tryptaminer, mens parene 5-MeO-DPT og 5-MeO-DiPT, EPT og 5-MeO-EPT, MiPT og 4-AcO-DET, og 4-OH-DET og 4-OH-MiPT ikke ble kromatografisk separert. Metoden kunne ikke identifisere 4-OH-DET, 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT.

Stabilitetsstudien for 21 tryptaminer i renstoffløsninger viste at ved tilfeller hvor bruksløsningene blir stående i romtemperatur vil de for dette utvalget av tryptaminer allikevel kunne brukes senere, med unntak av de acetoksy (AcO)-substituerte tryptaminene.

Stabilitetsstudien for 13 tryptaminer i fullblod viste at tiden mellom prøvetaking og rettstoksikologisk analyse ikke er kritisk for dette utvalget av tryptaminer, med unntak av de AcO-substituerte tryptaminene som bør analyseres uten mer ventetid enn nødvendig.

## Abstract

Tryptamines are a category of New psychoactive substances (NPS) and its occurrence is increasing. In addition, a renewed interest in the medical use of tryptamines may cause increased use in society. Therefore, it is relevant with methods for analysis of tryptamines.

An Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) method was developed for the separation and detection of 21 tryptamines. The chromatographic separation of the analytes was performed by reverse phase chromatography in biphenyl column (2,1 mm x 100 mm, 1,8  $\mu$ m particles) with a temperature of 60 °C, mobile phase flow 0,5 mL/min, injection volume 1,5  $\mu$ L and gradient elution of 7,5 min with 10 mM ammonium formate buffer with pH 3,1 and with methanol as organic modifier. Detection was performed with electron spray ionization (ESI) in positive mode and with multiple reaction monitoring (MRM) scan mode. The method was used for stability studies of the analytes in whole blood and in stock solutions in organic solvents. For sample preparation of tryptamines in whole blood protein precipitation (PPT) with acetonitrile: methanol (85:15, v/v) was used. Stability samples of tryptamines in whole blood/ organic solvents stored in room temperature, refrigerator and freezer was analyzed with UHPLC-MS/MS.

The gradient separated 13 tryptamines, while 5-MeO-DPT and 5-MeO-DiPT, EPT and 5-MeO-EPT, MiPT and 4-AcO-DET, and 4-OH-DET and 4-OH-MiPT was not chromatographic separated. The method was not able to identify 4-OH-DET, 5-MeO-DiPT and 5-MeO-DPT.

The stability study for 21 tryptamines in organic solvents, showed that in cases when the stock solutions are kept in room temperature they will still be able to be used again later for this selection of tryptamines, with the exception of the acetoxy substituted tryptamines. The stability study for 13 tryptamines in whole blood showed that the time between sampling and forensic toxicologic analysis is not critical for this selection of tryptamines, with the exception of the acetoxy substituted tryptamines that should be analyzed with no more waiting time than necessary.

## Forkortelser

μ	mikro
AcO	Acetoksi
EMCDDA	Det europeiske overvåkningscenteret for narkotika og narkotikamisbruk
ESI	Elektrosprayionisering
eV	Eltrovolt
EWS	Early Warning System
g	Gram
GC	Gasskromatografi
IS	Intern standard
k	kilo-
L	Liter
LC	Væskeskromatografi
LLE	Væske-væske-ekstraksjon
<i>m/z</i>	Masse-til-ladning
m	milli-
M	Molar
ME	Matrikseffekt
MeO	Metoksi
MF	Mobil fase
MRM	Multiple reaction monitoring
MS/MS	Tandem massespektrometri
MS	Massespektrometri
NPS	Nye psykoaktive substanser

OH	Hydroksi
OUS	Oslo universitetssykehus
pH	Power of Hydrogen
PPT	Proteinfelling
Q	Kvadrupol
QqQ	Trippel kvadrupol QqQ
R <sub>T</sub>	Retensjonstid
RSD	Relativt standardavvik
S/N	Signal/støy (noise)
SF	Stasjonær fase (SF)
SPE	Fast-fase-ekstraksjon
SMN	Standardmodusnettverket
t	Timer
UHPLC	Ultra-High Performance Liquid Chromatography
V	Volt

# Innholdsfortegnelse

Forord .....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	III
Forkortelser .....	IV
1. Innledning .....	1
1.1 Bakgrunn .....	1
1.1.1 Rettstoksikologi.....	1
1.1.2 Nye psykoaktive substanser (NPS) .....	1
1.1.3 Tryptaminer .....	3
1.2 Målsetning.....	5
2. Teori.....	6
2.1 Rettstoksikologiske analyser av biologiske prøver .....	6
2.1.1 Blod som biologisk matriks for rettstoksikologiske analyser.....	6
2.2 Prøveopparbeidelse .....	7
2.2.1 Proteinfelling (PPT) .....	7
2.2.2 Væske-væske-ekstraksjon (LLE) .....	8
2.3 Internstandard (IS).....	8
2.4 Separasjon av forbindelser i biologiske prøver .....	8
2.4.1 Båndspredning i LC kolonner .....	9
2.4.2 Utviklingen av UHPLC .....	11
2.4.3 Kromatografisk separasjon av forbindelser med UHPLC .....	11
2.4.4 Partikkelteknologi i UHPLC .....	12
2.4.5 Omvendtfasekromatografi.....	14
2.5 Deteksjon av forbindelser i biologiske prøver.....	15
2.5.1 Væskrokromatografi koblet til massespektrometri .....	15
2.5.2 Elektrosprayionisering.....	17
2.5.3 Matrikseffekter ved elektrosprayionisering.....	18
2.5.4 Masseanalysator .....	19
2.5.5 Tandem massespektrometri .....	20
2.6 Metodevalidering.....	22
2.6.1 Valideringsparametere for kvantitative analyser.....	22
2.7 Kunnskapstilstand .....	23
3. Eksperimentelt .....	25
3.1 Kjemikalier og materialer.....	25
3.1.1 Analytter og kjemikalier.....	25

3.1.2	Internstandard (IS).....	28
3.1.3	Utstyr.....	28
3.2	Tillaging av løsninger.....	29
3.2.1	Bruks-, standard- og kontrolløsninger.....	29
3.2.2	Blank.....	31
3.2.3	Buffer til UHPLC-analyse.....	31
3.3	Instrumentelt.....	31
3.3.1	Instrumentelle betingelser.....	31
3.4	Metodeutvikling.....	32
3.4.1	Optimalisering av MRM-overganger.....	32
3.4.2	Evaluering av UHPLC-kolonner.....	34
3.4.3	Optimalisering av gradienter.....	35
3.4.4	Kapillærspenning – Påvirkning på respons.....	35
3.4.5	MF-startkonsentrasjon – Påvirkning på retensjon på kolonnen.....	36
3.5	Prøveopparbeidelse.....	36
3.5.1	Proteinfelling (PPT).....	36
3.5.2	Væske-væske-ekstraksjon (LLE).....	37
3.6	Stabilitetsstudie.....	37
3.6.1	Stabilitet i renstoffløsninger.....	38
3.6.2	Stabilitet i blod.....	38
3.7	Dataanalyse.....	39
3.8	Validering.....	39
3.8.1	Utbytte.....	39
3.8.2	Mellom-serie-variasjon.....	40
4.	Resultater og diskusjon.....	41
4.1	Metodeutvikling.....	41
4.1.1	Fragmenteringsmønster.....	41
4.1.2	Vurdering av UHPLC-kolonner.....	42
4.1.3	Kapillærspenning – Påvirkning på respons.....	44
4.1.4	MF-startkonsentrasjon – Påvirkning på retensjon på kolonnen.....	45
4.1.5	Kromatografisk separasjon av tryptaminene.....	47
4.1.6	Vurdering av ulike opparbeidelsesmetoder.....	49
4.2	Stabilitetsstudie.....	54
4.2.1	Stabilitet i renstoffløsninger.....	54
4.2.2	Stabilitet i blod.....	57
4.3	Videre arbeid.....	64



5. Konklusjon.....	66
6. Litteraturliste.....	67
7. Vedlegg.....	71

# 1. Innledning

## 1.1 Bakgrunn

### 1.1.1 Rettstoksikologi

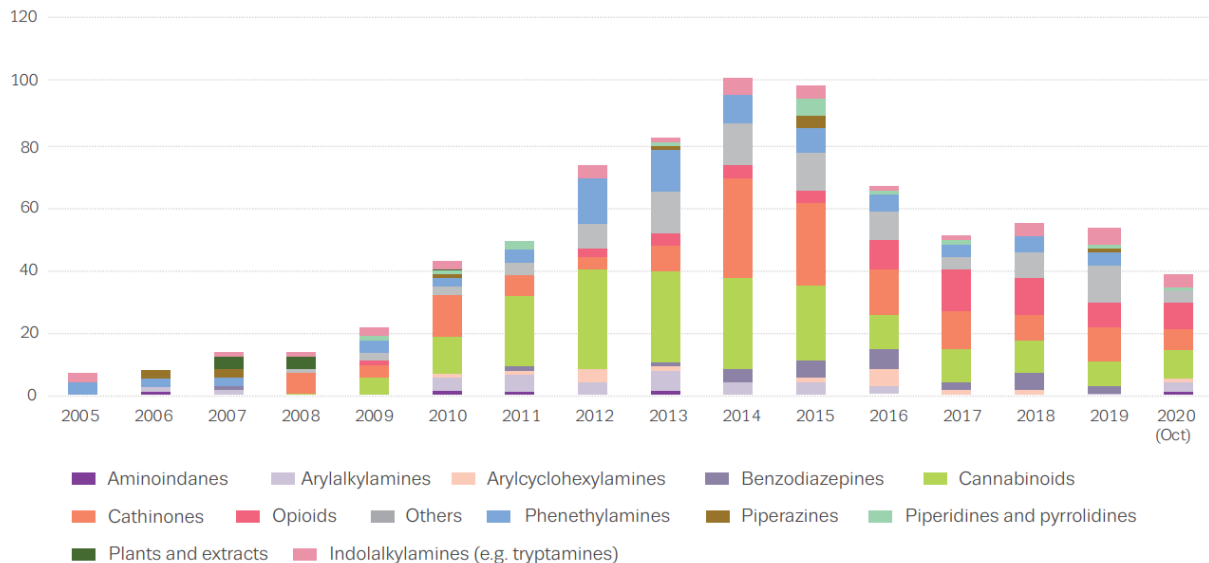
Rettstoksikologi er et bredt fagfelt som benytter vitenskap for å oppklare eller belyse straffesaker som omhandler skadelig virkning og omsetting av rusmidler, legemidler og gift i menneskekroppen (Olaisen, 2020) (Vindenes, 2021). Det største rettstoksikologiske laboratoriet i Norge er Seksjon for rettstoksikologisk analytikk ved Oslo universitetssykehus (OUS). Her utføres over 2,5 millioner enkeltanalyser i året, samt fortolkning av analyseresultater. Avdelingen utfører blant annet analyser ved «ruspåvirket kjøring, bruk av rusmidler/legemidler, forgiftninger» og adferd under rus for oppdragsgivere som hovedsakelig er «politiet/domstolene, kriminalomsorg, rettslige obduksjoner, barnevern og yrkesliv» (Oslo-universitetssykehus, 2016).

For deteksjon av rusmidler i biologisk materiale er metoder som kombinerer kromatografi og massespektrometri (MS) svært utbredt og ofte foretrukket på grunn av høy spesifisitet og sensitivitet (Maurer, 2006). En variant av denne teknikken, Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS), benyttes i rutinedriften til Avdelingen for rettstoksikologisk analytikk ved OUS og er utgangspunktet for metoden som ble utviklet i denne oppgaven.

### 1.1.2 Nye psykoaktive substanser (NPS)

Nye psykoaktive substanser (NPS) er syntetiske rusmidler som lages ved å modifisere strukturen til kjente rusmidler (Adamowicz & Tokarczyk, 2016). Stoffene handles hovedsakelig over nettet og kan gå under navnene «designerdop», «lovlig rus» og «herbal highs», noe som gir et feilaktig inntrykk av at stoffene er lovlige og ufarlige (Tuv et al., 2016). Det har vært en betydelig økning av NPS på narkotikamarkedet de siste tiårene. Per 31. oktober 2020 overvåket Det europeiske overvåkningscenteret for narkotika og

narkotikamisbruk (EMCDDA) over 820 NPS som hadde entret Europas narkotikamarked siden overvåkingen startet i 1997 (European Monitoring Centre for Drugs and Drug EMCDDA, 2020). Figur 1.1 viser omfanget av NPS som ble rapportert til EU Early Warning System (et varslingsprogram drevet av EMCDDA og Europol) for første gang fra 2005 til 31. oktober 2020. En undergruppe av NPS som har økt i senere år er tryptaminer, som er temaet for denne oppgaven.



Figur 1.1: Antall og kategorier av NPS rapportert til varslingsprogrammet EU Early Warning System for første gang mellom 2005 og 31. oktober 2020 (EMCDDA, 2020).

På slutten av 1990-tallet ble det dannet en lovgivning imot kjente rusmidler (EMCDDA, 2019). NPS ble til da strukturen til kjente rusmidler ble modifisert for å omgå loven (Araújo et al., 2015). Idet nye stoffer ble oppdaget måtte lovgivningen oppdateres, men NPS ble syntetisert hurtigere enn de kunne kontrolleres (Tuv et al., 2016). I 2013 ble det fastsatt en ny narkotikaforskrift i Norge. Denne definerer narkotika etter generelle strukturformler, istedenfor spesifikke molekylformler. Dermed faller NPS modifisert fra kjente rusmidler inn under kategorien narkotika og kontrolleres av det norske regelverket ("Forskrift om narkotika (narkotikaforskriften)," 2013), hvis de har eller antas å ha, psykoaktiv effekt. Det vil si at de resulterer i «hallusinasjoner, forstyrrelser i motoriske funksjoner, tenkning, adferd, oppfattelse eller sinnsstemning» ("Forskrift om narkotika (narkotikaforskriften)," 2013).

Det er knyttet en stor risiko til inntak av NPS, da brukeren ikke har noen garanti for

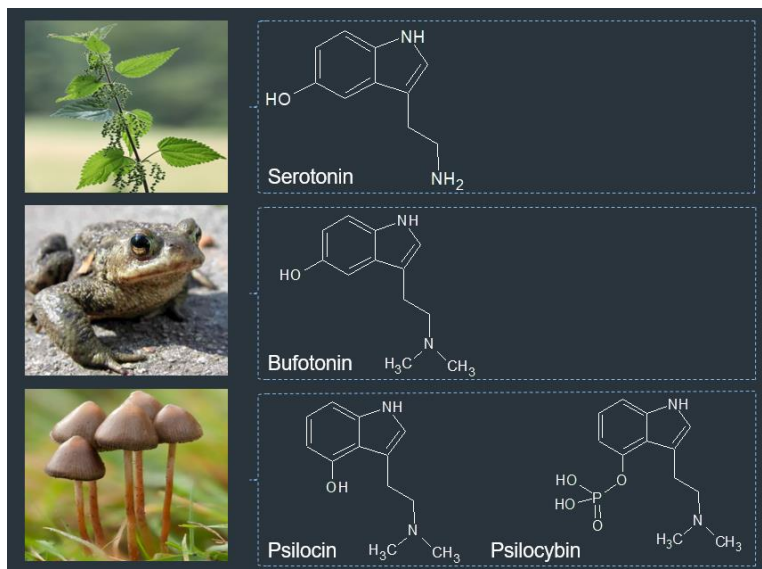
produktets innhold eller virkning (Flaminia et al., 2019). Det er en spesielt stor fare når stoffet er helt nytt og brukeren ikke er kjent med doseringsstyrken, noe som kan resultere i overdose. I tillegg er det en krevende prosess å detektere NPS ved forgiftning eller overdose på sykehuset, da de store strukturelle variasjonene mellom stoffene gjør det umulig med én enkelt test for deteksjon av alle disse (Simão et al., 2020). Deteksjonen vanskeliggjøres av at mange av stoffene er svært potente og finnes i små konsentrasjoner i biologiske prøver. Stoffene kan også omgjøres fullstendig til andre metabolitter. Ved identifisering kreves sammenligning av den detekterte forbindelsen med lovlig produsert referansesubstans (Tuv et al., 2016).

Varsling om nye rusmidler i fremmarsj utføres av EMCDDA i samarbeid med Europol, igjennom et varslingsprogram som kalles Early Warning System (EWS). I tillegg utfører EMCDDA risikovurdering av nye rusmidler, mens kontrolltiltak foreslås av EU-kommisjonen. Norge er medlem av EMCDDA (Tuv et al., 2016) og rapporterer til overvåkningssenteret to ganger i året. EMCDDA samler informasjon om nye funn av NPS, dødsfall og alvorlige forgiftninger grunnet NPS (EMCDDA, 2019). All informasjonen om NPS kan bistå helsepersonell med å gi bedre behandling av pasienter med forgiftning etter bruk av disse stoffene og bidra til at stoffene kan inkluderes i klinisk eller retts toksikologisk analysevirksomhet. I tillegg kan dødsfall hindres, ved at befolkningen varsles når spesielt farlige/potente stoffer er i omløp (Tuv et al., 2016).

### 1.1.3 Tryptaminer

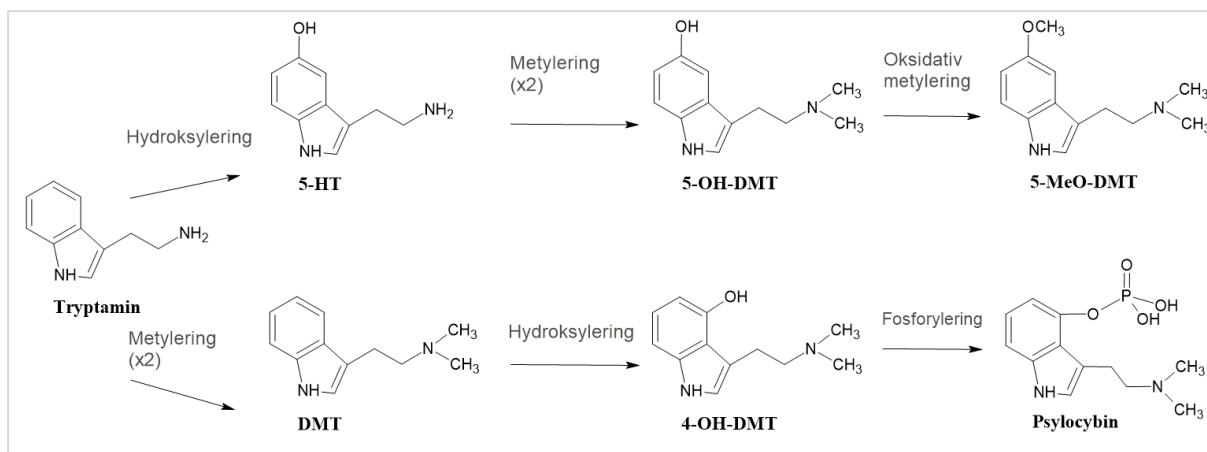
Tryptaminer tilhører undergruppen av psykoaktive substanser som kalles hallusinogener. Disse skiller seg fra de andre psykoaktive forbindelsene, da de verken fremmer eller demper eksisterende tilstander av bevissthet, men heller skaper unike tilstander hvor miljøet og «selvet» kan oppfattes på en ny måte (Nichols, 2004). Inntak av tryptaminer kan også føre til angst, desorientering, forvirring og svekket vurderingsevne (Varì et al., 2019). I tillegg har tryptaminer et forgiftningspotensiale, da stoffene har innvirkning på hjerterytme, blodtrykk og puste- og nyrefunksjon. Det er registrert flere overdosedødsfall grunnet tryptaminer (Sklerov et al., 2005; Tanaka et al., 2006), men det er allikevel den hallusinogene effekten som er den farligste virkningen (Nichols, 2004) da den kan føre til en rekke alvorlige situasjoner.

En rekke tryptaminer er utbredt i naturen og de finnes i planter, dyr og sopp. Noen naturlige kilder til tryptaminer er vist i figur 1.2. F.eks. 5-hydroksytryptamin (5-HT), også kjent som serotonin, som er et giftstoff i flere planter, i tillegg til å være et viktig signalstoff i sentralnervesystemet vårt (Brandt et al., 2004; Dewick, 2009). Et annet naturlig forekommende tryptamin er 5-hydroksy-N,N-dimetyltryptamin (5-OH-DMT), også kalt bufotenin, som finnes i hudkjertlene til padder av slekten *Bufo*. Fleinsopp inneholder tryptaminene psilocybin og psilocin (4-OH-DMT) (Dewick, 2009). Ved inntak av soppen omgjøres psilocybin til psilocin, og det er denne som er ansvarlig for soppens hallusinogene egenskaper (McKenna & Riba, 2018). Figur 1.3 viser hvordan de nevnte tryptaminene kan syntetiseres med tryptamin som utgangsstoff.



Figur 1.2: Naturlige kilder til et utvalg tryptaminer. Serotonin finnes i brennesle (*Urtica dioica*) (Norsk Botanisk Forening, 2021), bufotenin finnes i padder (*Bufo bufo*) (Skei, 2021), og psilocin og psilocybin finnes i fleinsopp (*Psilocybe semilanceata*) (First Nature, 2021).

Tilegning av kunnskap om tryptaminer er svært aktuelt, da funn av seks tryptaminer ble gjort ved Tolletaten det siste året (Tolletaten, 2020). Det gjelder tryptaminene 4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-OH-DMT (psilocin), 4-OH-MET, 5-OH-DMT (bufotenin) og DMT, som alle er inkludert i denne oppgaven. I tillegg ble ni nye tryptaminer detektert for første gang i Europa i 2019/2020 (EMCDDA, 2020).



Figur 1.3: Biosyntese av ulike tryptaminer med tryptamin som utgangsstoff.

## Medisinsk behandling med tryptaminer

Det har siden 1950 vært en interesse rundt hvordan tryptaminer bidrar i hjernens signaliseringsprosesser. Det har i tillegg vært en mistanke om at stoffene kunne brukes til behandling av sykdomstilstander som schizofreni, Parkinson og Alzheimers (Brandt et al., 2004).

I hjernen finnes en tilstand som kalles standardmodusnettverket (SMN) som kan knyttes til de hjerneprosessene som er aktive ved grubling og selvkritikk (Garrison et al., 2015). Hos personer med Alzheimers ble det i 2018 oppdaget en overaktivitet i SMN om natten, noe som kan forverre nevrodegenerasjonen. Det forskes på om tryptaminer kan motvirke dette. I så fall vil tryptaminer være en mulig behandling av ikke bare Alzheimers, men også andre sykdommer knyttet til mental aldring (Cameron & Olson, 2018; Hardeland et al., 2006; Stanford, 2018). Flere tryptaminer har også vist en langvarig antidepressiv effekt, i tillegg til å ha vist gode resultater for behandling av angst, røyking og alkoholisme (Garrison et al., 2015; Nutt, 2019). Siden medisinsk bruk av tryptaminer har fått fornyet interesse kan dette føre til økt bruk i samfunnet og dette gjør det aktuelt med metoder for analyse av tryptaminer.

## 1.2 Målsetning

Målet for oppgaven var å utvikle en UHPLC-MS/MS-metode for analyse av ulike tryptaminer og å studere stabilitet av stoffene i fullblod og i stamløsninger i organiske løsningsmidler. Resultatene er relevante for rutinedriften ved Avdeling for rettsmedisinske fag ved OUS.

## 2. Teori

### 2.1 Rettstoksikologiske analyser av biologiske prøver

Det vitenskapelige fagfeltet rettstoksikologi tar for seg deteksjon og tolkning av rusmidler og giftstoffer i biologiske prøver. Dette er en utfordrende oppgave da identiteten til inntatt forbindelse ofte er ukjent, i tillegg til at den befinner seg i en kompleks biologisk matriks, som f.eks. blod (Bergh, 2020). Om forbindelsen er potent eller ustabil kan den være spesielt utfordrende å detektere, da den kan finnes i svært lave konsentrasjoner eller den kan være omgjort til andre metabolitter. Dermed kreves en analytisk metode som er sensitiv, spesifikk og selektiv (Adamowicz & Tokarczyk, 2016). Et system som oppfyller disse kravene er LC-MS/MS, som er et av de mest brukte i rettstoksikologi. Væskekromatografi (LC) og massepektrometri (MS) forklares nærmere i kapittel 2.4 og 2.5. Til sist, for at rettstoksikologiske analyser skal kunne brukes som bevis i en rettssak er analysen nødt til å være pålitelig og produsere nøyaktige resultater av høy kvalitet. For å oppnå dette bør de analytiske metodene valideres etter gitte retningslinjer for metodevalidering i rettstoksikologi (se kapittel 2.6) ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013).

#### 2.1.1 Blod som biologisk matriks for rettstoksikologiske analyser

Av biologiske matrikser er det kun blod, foruten cerebrospinalvæske, som gjenspeiler rusmiddelkonsentrasjonen i hjernen (Gjerde et al., 2011). Dette gjør blod til ønsket biologisk matriks ved straffesaker hvor det undersøkes om gjerningspersonen var ruspåvirket i gjerningsøyeblikket, samt ved rettstoksikologiske obduksjonsanalyser, da blod best representerer konsentrasjonen av aktuell forbindelse i blodet før dødsfallet. Denne konsentrasjonen kan benyttes til å fastslå om inntatt forbindelse var til stede i terapeutisk, giftig eller dødelig mengde ved dødstidspunktet (Negrusz, 2013). Denne referanseverdien er kjent for de fleste rusmidler (Schulz et al., 2012). En utfordring med blod hentet inn fra etter døden er tilstedeværelsen av forstyrrende komponenter som dannes i kroppens nedbrytningsprosess. Det er en fare for at disse ekstraheres ut av matriksen sammen med analytt og skaper problemer for deteksjonen (Negrusz, 2013). Ved deteksjon av rusmidler i blod er en ulempe

den korte tidsperioden den aktuelle forbindelsen kan detekteres. F.eks. kan kokain detekteres i blod inntil 8 t etter inntak, mens i urin kan kokain detekteres opptil et par dager etter inntak. Den biologiske matriksen med lengst deteksjonsvindu for rusmidler er hår, hvor kokain kan detekteres måneder etter inntak (Gjerde et al., 2011).

## 2.2 Prøveopparbeidelse

Hovedmålet med prøveopparbeidelsen er å isolere analytt fra de andre komponentene i prøvematriksen. Biologiske matrikser er komplekse med innhold av blant annet proteiner, fosfolipider og salter. Om disse komponentene ikke minimeres påvirkes ioniseringen av analytt og analysens nøyaktighet og sensitivitet påvirkes (Taylor, 2005), i tillegg til at instrumentkomponenter kan tettes igjen eller ødelegges (King et al., 2000). Påvirkningen matrikskomponentene har på analysen kalles matrikseffekter (ME). Disse bør valideres for kvantitative analyser ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013). Prøveopparbeidelse kan også utføres for oppkonsentrering av analytt, noe som kan være nødvendig ved lave analyttkonsentrasjoner for å sikre deteksjon.

Vanlige teknikker for prøveopparbeidelse av biologiske matrikser er varianter av proteinfelling (PPT) og væske-væske-ekstraksjon (LLE) (Montesano et al., 2017). Teknikkene er beskrevet nedenfor. Det er en rekke andre prøveopparbeidelsesmetoder som kan anvendes for biologiske prøver som f.eks. immobilisert LLE, fosfolipidfjerningskolonner og fast-fase-ekstraksjon (SPE). Disse ble ikke benyttet i oppgaven og blir ikke beskrevet.

### 2.2.1 Proteinfelling (PPT)

Metodene går ut på å blande sammen prøven, intern standard (IS) og en utfellingsagent som f.eks. acetonitril eller metanol/ZnSO<sub>4</sub>. Blandingen sentrifugeres eller filtreres for å separere utfelte proteiner og supernatanten kan tilføres LC-MS/MS.

Fordelene med disse metodene er at de er raske, enkle og billige ((Polson et al., 2003), (Stone, 2018)). Metodene kan benyttes for rensing av prøven alene eller de kan etterfølges av ekstraksjon.



### 2.2.2 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)

Metodene går ut på å overføre analytt fra en vandig væske til et organisk løsemiddel, vandig og organisk fase separeres, det organiske løsemiddelet fordampes og analytt oppløses i et løsemiddel som er blandbart med den mobile fasen i LC. Disse metodene gir mulighet for oppkonsentrering av analytt, bedre sensitivitet og økt selektivitet ved fjerning av matrikskomponenter (Stone, 2018).

## 2.3 Internstandard (IS)

IS er en forbindelse som tilsettes prøven for å kompensere for eventuelle tap av analytt i løpet av analyseprosessen. For å oppnå samme oppførsel i løpet av prøveopparbeidelse, separasjon og deteksjon bør IS være så lik analytt som mulig. Bruk av stabil isotopmerket IS anbefales av flere rettsstoksikologiske retningslinjer ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013). I IS er atomer i molekylet erstattet med stabile isotoper som f.eks.  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  eller  $^{18}\text{O}$ . For å hindre interaksjon med de naturlige forekommende isotopene av analytt bør IS inneholde tre eller flere stabile isotoper (Berg et al., 2014). Hvis  $^2\text{H}$  benyttes som isotop bør antallet ellers være så lavt som mulig, siden  $R_T$  mellom umerket analytt og  $^2\text{H}$ -merket analytt er antatt å øke med økende antall isotoper. Likest  $R_T$  mellom analytt og IS oppnås ved å benytte IS merket med stabile isotoper av  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  eller  $^{18}\text{O}$  (Berg et al., 2014). Ved bruk av én IS til kvantifisering av flere analytter kan det være en fordel å benytte  $^2\text{H}$ -isotopmerket IS, da de andre nevnte variantene kan føre til undertrykt IS signal ved høye analytt-konsentrasjoner grunnet ME og kvantifiseringen av alle analyttene blir dermed forstyrret (Berg & Strand, 2011).

## 2.4 Separasjon av forbindelser i biologiske prøver

Den biologiske prøven som skal analyseres inneholder også andre forbindelser i tillegg til analytt. Disse må separeres fra hverandre. En mye brukt teknikk for separasjon er kromatografi. Denne separasjonsprosessen baserer seg på at ulike forbindelser fordeler seg ulikt mellom to ikke-blandbare faser; en stasjonær (SF) og en mobil fase (MF). MF beveger

seg kontinuerlig igjennom SF og den fører også med seg den aktuelle prøven. Molekylene av forbindelsene i prøven kan enten oppholde seg i MF og forflytte seg i dens fart, eller i SF, noe som hindrer videre bevegelse. Vekslingen mellom hvilken fase molekylene oppholder seg i forekommer flere ganger i løpet av separasjonsprosessen (Miller, 2009). Det er forbindelsenes forskjeller i kjemiske og fysiske egenskaper som resulterer i at de holdes tilbake i ulik grad og dermed blir separert.

To vanlige kromatografiteknikker er væske- og gasskromatografi. Begge teknikkene foregår i en kolonne bestående av en SF, men de benytter MF med ulik fysisk tilstand. Ved rusmiddelanalyse benyttes ofte væskrokromatografi (LC), dvs. kromatografi med MF i væskeform. En av grunnene til dette er at mange rusmidler er ikke-flyktige (He & Concheiro-Guisan, 2019) og dermed ikke direkte kompatible med gasskromatografi (GC). LC har også fordelen med at det finnes et bredt utvalg av stasjonære og mobile faser som kan benyttes for å utvikle en spesifikk og selektiv metode.

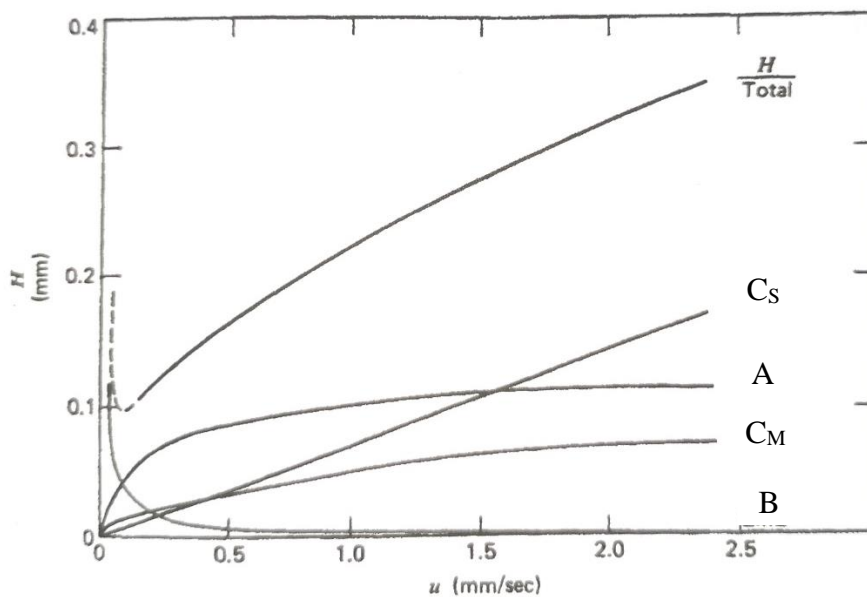
#### 2.4.1 Båndspredning i LC kolonner

Ideelt sett innføres analytt på LC-kolonnen som et smalt bånd, men ulike faktorer fører til at båndet blir bredere i løpet av analysen. Båndbreddening fører til et lavere signal-til-støy-forhold, noe som er uønsket da dette reduserer analysens sensitivitet og vanskeliggjør deteksjon og kvantifisering av analytt.

Faktorene som bidrar til båndbreddening er vist under i *utvidet van Deemters ligning* (Miller, 2009):

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M)u \quad (1)$$

Ligningen viser hvordan platehøyden (H) i LC påvirkes av fire faktorer A, B, C<sub>S</sub> og C<sub>M</sub>, henholdsvis eddydiffusjon, langsgående molekylær diffusjon og masseoverføring i stasjonær og mobil fase. Ved å endre på den lineære MF-hastigheten (u) endres graden av påvirkning fra faktorene B, C<sub>S</sub> og C<sub>M</sub>. Den optimale MF-hastigheten kan avleses fra et van Deemter plott (Figur 2.1) som viser sammenhengen mellom H og u. Grafen har et minimum og dette er den hastigheten som gir lavest platehøyde, eller med andre ord, høyest kolonneeffektivitet.



Figur 2.1: Van Deemter plott viser sammenhengen mellom platehøyde ( $H$ ) (y-aksen) og mobilfasehastighet ( $u$ ) (x-aksen). Faktorene masseoverføring i SF ( $C_S$ ), eddydiffusjon ( $A$ ), masseoverføring i MF ( $C_M$ ) og langsgående molekylær diffusjon ( $B$ ) påvirker  $H$ . (Miller, 2009).

De ulike faktorene som bidrar til båndspredning beskrives kort nedenfor (Miller, 2009):

- Eddydiffusjon ( $A$ ) innebærer at analyttmolekyler finner ulike veier igjennom partiklene i SF.
- Langsgående molekylær diffusjon ( $B$ ) innebærer at analyttmolekyler forflytter seg til områder i MF med lavere analyttkonsentrasjon.
- Masseoverføring i SF ( $C_S$ ) innebærer overføring av analytt inn i og ut av SF.
- Masseoverføring i MF ( $C_M$ ) innebærer at analyttmolekylene får ulik fart avhengig av hvor i kolonnen de befinner seg. For eksempel bremses analyttmolekyler som befinner seg nær kolonneveggen grunnet friksjon, eller hvis analyttmolekyler havner bak andre trege molekyler. I tillegg forekommer båndspredning grunnet masseoverføring i stillestående MF, som innebærer at analyttmolekyler oppholder seg i den stillestående MF i porene til SF.

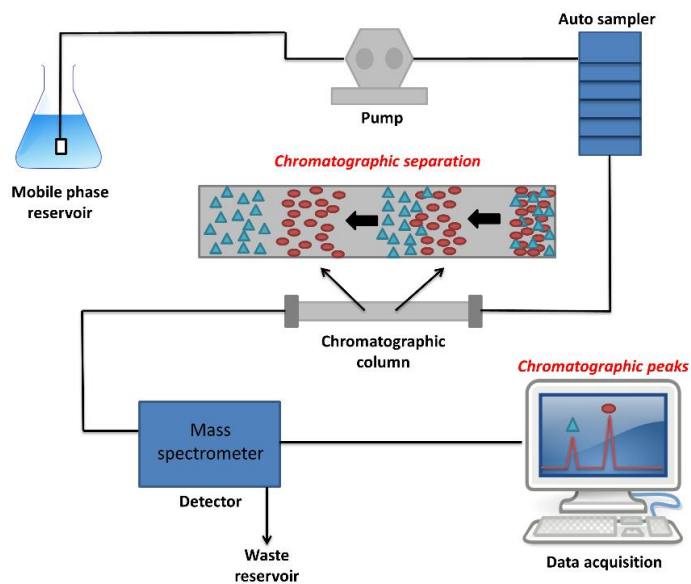
## 2.4.2 Utviklingen av UHPLC

LC har med tiden utviklet seg til å gi bedre separasjonsevne og hurtigere analyser. Dette ble oppnådd ved reduksjon av partikkelstørrelsen til partiklene som SF er pakket med. Når partikkelstørrelsen reduseres påvirkes flere ledd i *utvidet van Deemters ligning* (ligning 1). Både eddydiffusjon (A) og masseoverføring av analytt i SF ( $C_s$ ) reduseres, noe som gir økt kolonneeffektivitet og analysen kan dermed utføres i en kortere kolonne eller med hurtigere MF-hastighet uten tap av analysens sensitivitet (Levine, 2003). Ved begge tilfeller oppnås hurtigere analyser. Når størrelsen til pakkingspartiklene reduseres kreves til gjengjeld mer av instrumentet for å føre MF igjennom SF. Det blir nødvendig med pumper som kan levere et enda høyere trykk og instrumenter som tåler det høye trykket. Dette la grunnlaget for utviklingen av instrumentet UHPLC (Ultra-High-Performance Liquid Chromatograph). I instrumentet brukes kolonner med SF pakket med 1,6-1,8  $\mu\text{m}$ -partikler og pumper som kan produsere et trykk på over 1000 bar (Waters, 2015).

## 2.4.3 Kromatografisk separasjon av forbindelser med UHPLC

Separasjon av analytter i UHPLC-kolonnen forekommer ved at analyttene har ulike interaksjoner med MF og SF, og dermed bruker ulik tid (retensjonstid,  $R_T$ ) igjennom kolonnen. Fysiske krefter og interaksjoner som kan forekomme i kolonnen er adsorpsjon, ioniske interaksjoner, van der Waals-krefter, hydrogenbindinger og ladningsoverføring (Miller, 2009).

En oversikt over de viktigste komponentene i et UHPLC-instrument er vist i figur 2.2. MF oppbevares i et reservoar og føres igjennom systemet ved hjelp av en pumpe med evne til å levere et høyt trykk. I en autosampler holdes prøven ved ønsket temperatur, til den føres inn i systemet sammen med MF. Separasjonen finner sted i den kromatografiske kolonnen og analytt/-ene detekteres i detektoren før signalet, i form av kromatografiske topper, kan avleses på en datamaskin.



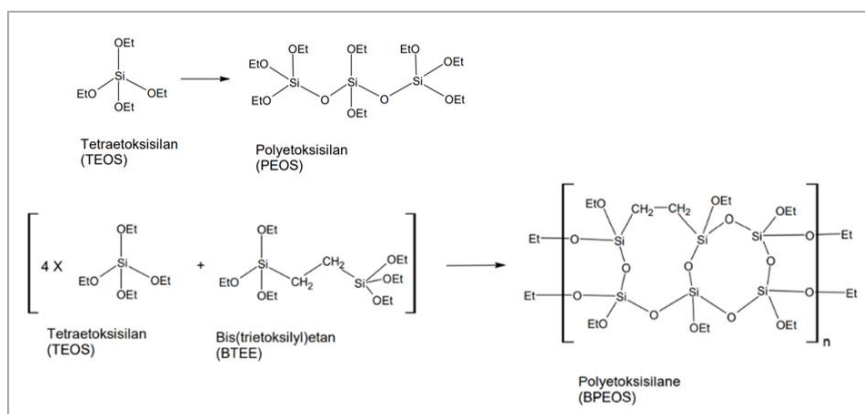
Figur 2.2: Skjematisk fremvisning av et UHPLC-instrument (Bergh, 2020). Figuren er gjengitt med tillatelse.

#### 2.4.4 Partikkelteknologi i UHPLC

Kolonner for UHPLC er tradisjonelt pakket med små, uniforme og porøse silikapartikler. Når MF strømmer igjennom en kolonne pakket med porøse partikler, fylles rommet mellom partiklene og partiklenes porer av MF. Dette gir analytt et stort område for interaksjon. Partiklenes oppbygning kan være silika- eller hybridbasert (figur 2.3). En av de største forskjellene mellom disse partiklene er deres grad av stabilitet. Hybridbaserte partikler har den desidert beste stabiliteten og tåler en pH fra 1 til 12, i forhold til pH-området fra 2 til 8 for silikabaserte partikler. Fordelen med mer stabile partikler er at et bredere utvalg av MF kan benyttes og analysens selektivitet kan påvirkes i større grad. Begge partikkeltypene har silanolgrupper på overflaten som kan reageres med ulike overflategrupper for å påvirke partiklenes kromatografiske selektivitet (Levine, 2003). F.eks. benyttes aromatiske overflategrupper som bifenyl for separasjon av aromatiske forbindelser.

Et alternativ til fullstendig porøse partikler er core-shell partikler. Disse er laget av silika og har kun et porøst skall, utenpå en hard, sfærisk kjerne. Bruk av disse partiklene har en rekke fordeler fremfor fullstendig porøse partikler. Siden analytt ikke kan trenge inn i den harde partikkelkjernen, reduseres uttrykk  $C_s$  i ligning 1 (Gumustas et al., 2019). I tillegg reduseres

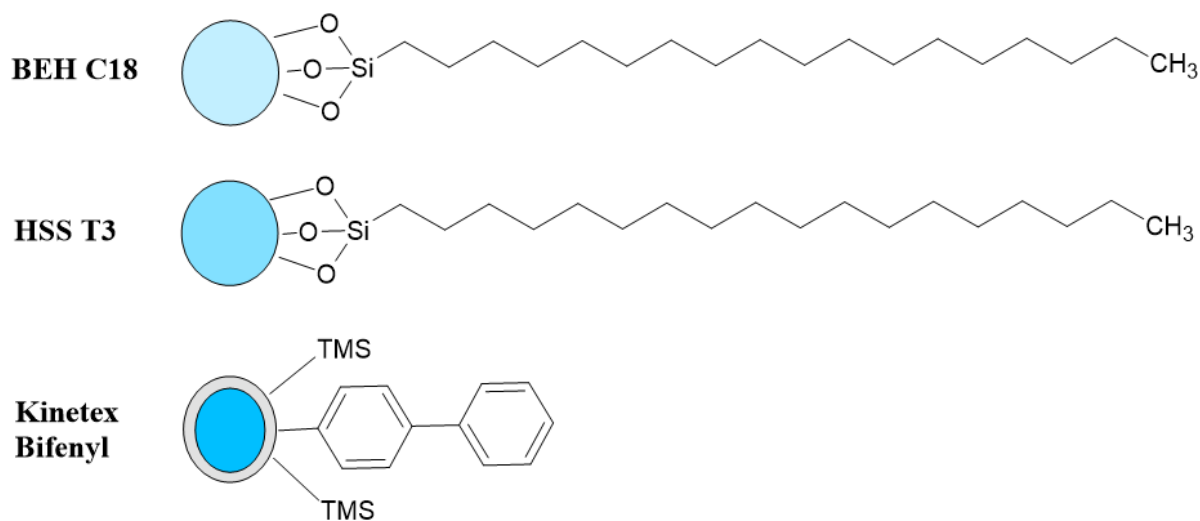
eddydiffusjon (A) siden core-shell partikler har en smalere partikkelstørrelsesfordeling og kan pakkes tettere sammen enn fullstendig porøse partikler. Den økte pakkingstettheten og tilstedeværelsen av de harde, ugjennomtrengelige kjernene fører til at analytt får færre områder å bevege seg i, noe som reduserer molekylær diffusjon av analytt (B) (Gumustas et al., 2019). Det oppnås forbedret kolonneeffektivitet ved benyttelse av en kolonne pakket med core-shell partikler fremfor en med fullstendig porøse partikler. Dette vises i form av smalere topper, noe som medfører høyere signal-til-støy (S/N)-forhold og økt sensitivitet.



Figur 2.3: Oppbygningen av silika- og hybridbaserte partikler (Waters, 2015), henholdsvis øverst og nederst. Figuren er laget i «ACD/ChemSketch».

Et utvalg tryptaminer ble i denne oppgaven separert ved hjelp av tre ulike kolonner: BEH C18 og HSS T3 fra Waters og Kinetex Bifenyl fra Phenomenex (figur 2.4). Deres partikkelteknologi og virkemåte forklares kort nedenfor:

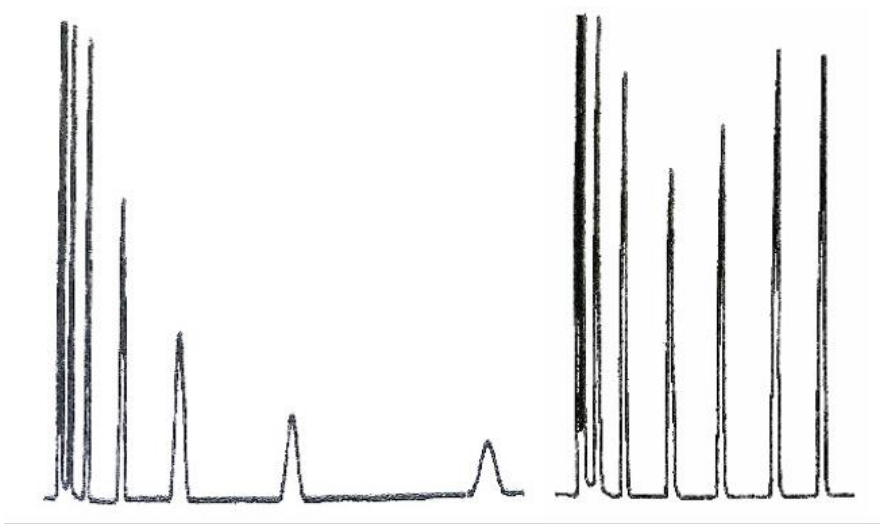
De to førstnevnte kolonnene er pakket av fullstendig porøse partikler og er påsatt samme overflategrupper; alkylkjeder bestående av 18 karbonatomer. HSS T3-kolonnen har den laveste tettheten av disse (1,6 mot 3,1  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ ), noe som gir analytt enklere tilgang til partiklene og retensjonstiden øker. Denne skal være et bedre alternativ for separasjon av polare forbindelser, enn den allsidige BEH (Waters, 2015). En forskjell mellom HSS- og BEH-kolonnene er at de baserer seg på henholdsvis silika- og hybridbasert partikkelteknologi (figur 2.3). Kinetex bifenyl består av core-shell partikler og er påsatt bifenyl som overflategruppe. Denne gir en selektivitet spesielt god for aromatiske forbindelser ved å skape  $\pi$ - $\pi$ -interaksjoner (Phenomenex, 2021).



Figur 2.4: Partikkel fra BEH C18, HSS T3 og Kinetex Bifenyl med tilhørende overflategrupper. Figuren er laget i «ACD/ChemSketch» ut ifra informasjon hentet fra produsentenes nettsider (Phenomenex, 2021) (Waters, 2015).

### 2.4.5 Omvendtfasekromatografi

I LC er det mest brukte prinsippet omvendtfasekromatografi. Det består av benyttelse av en upolar SF i kombinasjon med en polar MF (Miller, 2009). Ved separasjon av en blanding vil de mest polare eluere først og de minst polare til sist. Omvendtfasekromatografi kan utføres med MF av kun et løsemiddel eller av en blanding. Vanligvis består MF av to blandbare løsninger, en vandig løsning som er pH-kontrollert med buffere eller syrer (løsemiddel A) og en organisk løsning (løsemiddel B) som f.eks. metanol eller acetonitril. Når blandingsforholdet til MF holdes konstant kalles separasjonen *isokratisk*. Ved separasjon av en blanding av forbindelser med varierte affiniteter vil denne teknikken gi god sensitivitet for stoffene som eluerer tidlig eller sent, men ikke begge. I dette tilfellet bør det heller benyttes *gradient*, dvs. at andelen av løsemiddel B i MF økes underveis i separasjonen. Denne teknikken vil redusere analysetiden og gi forbedret sensitivitet (Miller, 2009)(figur 2.5).



Figur 2.5: Et typisk resultat for isokratisk (venstre) og gradient separasjon (høyre) av en blanding (Miller, 2009).

## 2.5 Deteksjon av forbindelser i biologiske prøver

Etter separasjon av forbindelsene i UHPLC-instrumentet eluerer forbindelsene og entrer en detektor. Det er flere detektorer tilgjengelig, som for eksempel UV, fluorescens og MS (Miller, 2009). I retts toksikologi er det mest vanlig å benytte MS (Maurer, 2006), denne er også benyttet i denne oppgaven og beskrives nærmere i neste kapittel.

### 2.5.1 Væskekromatografi koblet til massespektrometri

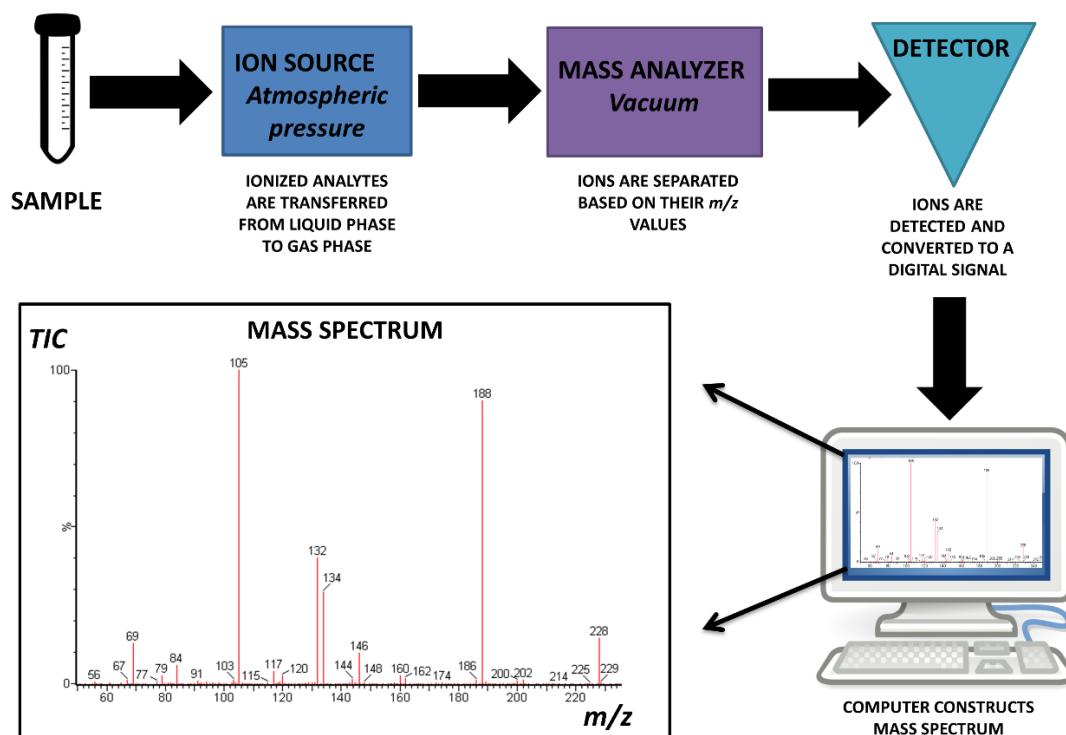
Identifisering av analytt kan utføres kromatografisk ved å sammenligne retensjonstidene til analytt og standard, men for bekreftelse må en spesifikk detektor tas i bruk og den vanligste er MS (Miller, 2009).

Massespektrometri fungerer ved at forbindelsen som skal detekteres (analytt) ioniseres, dvs. omdannes til positive eller negative ioner i gassfase. Analyttioner og eventuelle fragmentioner separeres i en masseanalysator ut ifra ulike masse-til-ladnings( $m/z$ )-forhold og ankommer en detektor, hvor de omgjøres til et elektrisk signal med en styrke som er knyttet til antall detekterte ioner. Resultatet vises på en datamaskin i form av et massespekter som er unikt for hver enkelt forbindelse og som benyttes til både identifisering og kvantifisering (Miller, 2009). En avgjørende faktor for denne metoden er at instrumentet opererer under vakuum.



Dette vil forhindre at ionene kolliderer med andre gassatomer og utlades før de når detektoren. Oppbygningen av MS er vist i figur 2.6.

Når LC og MS skal kobles sammen er en av utfordringene den store trykkforskjellen som skiller disse metodene fra hverandre; LC opererer ved høyt trykk, mens MS opererer ved vakuum. I tillegg er analytt som analyseres med LC i væskeform, mens med MS er den ioner i gassfase. For å overkomme denne overgangen må analytt igjennom en ioniseringskilde som er plassert imellom de to instrumentene. Ioniseringskilden opererer ved atmosfærisk trykk og overfører analytt til ioner i gassfase. Før ionene kan innføres MS-instrumentet må også trykkforskjellen håndteres. Dette lar seg gjøre ved å bruke linser med økende spenning til å akselerere ionene igjennom flere kammer med gradvis avtagende trykk, helt til vakuum er nådd og ionene innføres MS (Hoffmann & Stroobant, 2007).



Figur 2.6: Oppbygningen av MS består av en sprøyte som innfører prøve til systemet, en ioniseringskilde som overfører analytt fra væskefase til ioner i gassfase, en masseanalysator som separerer ioner basert på deres  $m/z$ -ratio, en detektor som omgjør ionene til et elektrisk signal og en PC som tolker signalet og fremviser dette i form av massespekter. Figuren er gjengitt med tillatelse (Bergh, 2020).

## 2.5.2 Elektrosprayionisering

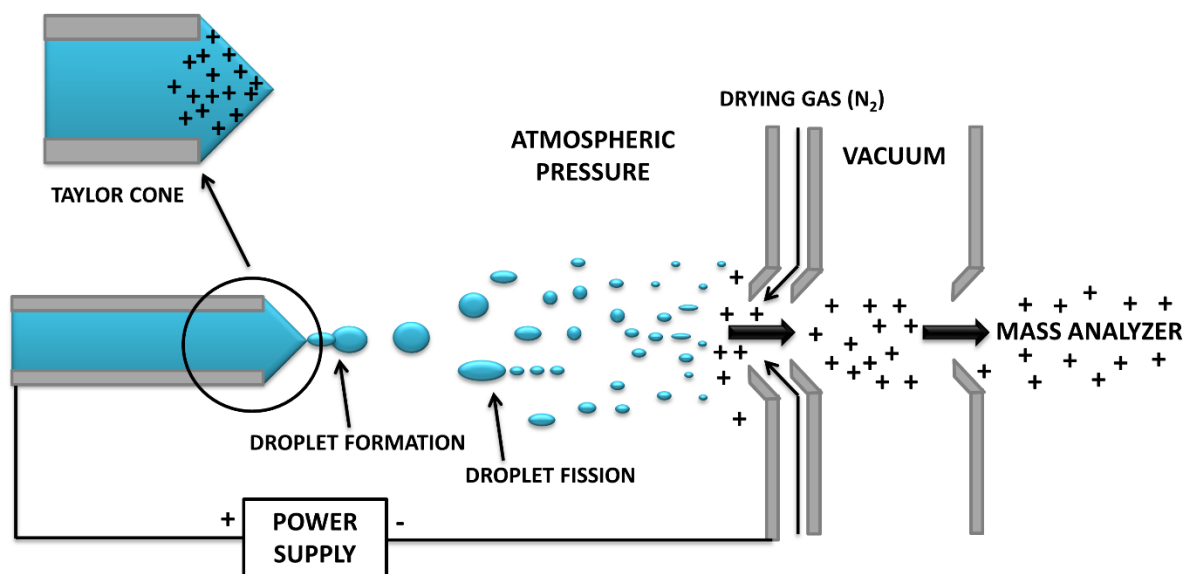
Elektrosprayionisering (ESI) er en myk ioniseringsteknikk som resulterer i protonerte  $[M+H]^+$  eller deprotonerte  $[M-H]^+$  molekyllioner, avhengig av om ioniseringen forekommer i positiv eller negativ modus, uten å føre til dannelse av fragmenter. I tillegg til molekyllioner, dannes også adduksjoner som f.eks.  $[M+Na]^+$  eller  $[M+NH_4]^+$ . Valget mellom positiv eller negativ ionisering avhenger av om analytt/-ene er baser eller syrer. Tryptaminer er baser og for disse benyttes positiv ionisering.

Elektrosprayionisering består av tre trinn: (1) Dannelse av en fin spray av ladede dråper, (2) løsemiddelfordampning og (3) utstøtning av ioner fra de ladede dråpene (Fenn et al., 1989).

Se figur 2.7. De ulike trinnene forklares grundigere nedenfor:

- 1) Analytt sendes igjennom et kapillærrør påsatt en høy spenning og ioner med motsatt ladning fjernes fra løsningen (Kearle & Peschke, 2000). Hvis positiv spenning benyttes, vil negative ioner fjernes fra løsningen og gjenværende løsning inneholder da bare positive ioner. Disse drives til tuppen av kapillæren hvor det dannes en voksende dråpe med en økende ladningsansamling. Til slutt nås et kritisk punkt for den voksende dråpen. Dette punktet kalles «Rayleigh limit» og forekommer når Coulombs frastøting blir sterkere enn overflatespenningen (Cole, 2019) og dråpen deformeres til en «taylor-kjegle» som frigjør mindre dråper. Spredningen av dråpene assisteres av en gass som påføres parallelt med kapillæren.
- 2) Den høye temperaturen i ESI-kilden og/eller en strøm av tørkegass (vanligvis nitrogen) fører til fordampning av løsemiddelet i dråpen. Dermed øker dråpenes ladningstetthet.
- 3) Den økende ladningstettheten og det sterke elektriske feltet fører til at «Rayleigh limit» igjen nås, og en ny «taylor-kjegle» dannes og frigjøring av mindre dråper finner sted. Denne prosessen gjentas til dråpens ladningstetthet er så høy at det blir fysisk mulig å frigjøre små analyttioner direkte fra dråpens overflate.

Deretter føres analyttionene inn i masseanalysatoren hvor fragmentering og separasjon forekommer, før ionene detekteres i detektoren.



Figur 2.7: Positiv ESI. Analytt i væskeform ankommer ESI fra LC, omgjøres til analyttioner i gassfase og innføres MS. Gjengjett med tillatelse (Bergh, 2020).

### 2.5.3 Matrikseffekter ved elektro sprayionisering

ESI er den foretrukne ioniseringskilden ved bioanalyser med LC-MS (Taylor, 2005). En utfordring med ESI er derimot dens mottakelighet for matrikseffekter (ME), som resulterer i at resultatet for en analytt i standardløsning blir annerledes enn for analytt i en blanding. Matriks kan føre til uønsket demping eller forsterking av ioniseringen av analytt, grunnet konkurranse mellom ikke-flyktige komponenter og analyttioner om tilgang til dråpens overflate for overføring til gassfase, og påvirker metodens deteksjonsevne, sensitivitet, selektivitet, reproduserbarhet, nøyaktighet og lineariteten til responsen (respons versus konsentrasjon) (Taylor, 2005). Komponenter som kan føre til ME er salter, karbohydrater, aminer, urea, lipider, peptider eller andre rusmidler eller metabolitter av disse (Gosetti et al., 2010).

Den viktigste tilnærmingen for å redusere matrikseffekter er ved å optimalisere prøveopparbeidelsesmetoden for å begrense forstyrrende komponenter i løsningen som skal analyseres (Gosetti et al., 2010). I tillegg kan den kromatografiske separasjonen optimaliseres slik at man får skilt analytt fra komponenter som kan gi ME. Siden sammenhengen mellom grad av ionedemping og mengden av MF i ioniseringskammeret har vist seg å være proporsjonal, kan en annen tilnærming være å redusere MF-mengden. Det kan også hjelpe å

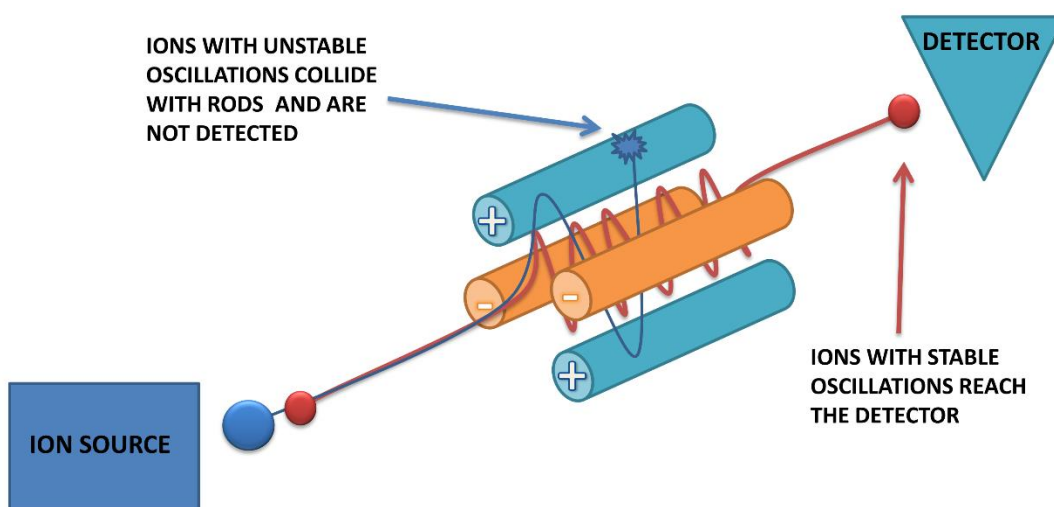
fortynne prøveløsningen, da mengden av forstyrrende matrikskomponenter reduseres. Benyttelse av IS kan korrigere for ME, spesielt ved bruk av en IS som er så lik analytt som mulig (f.eks. merket med  $^{13}\text{C}$  istedenfor  $^2\text{H}$ ).

## 2.5.4 Masseanalysator

Masseanalysatorer separerer ioner ut ifra prinsippet om at ionenes bevegelse igjennom et elektrisk eller magnetisk felt påvirkes av deres  $m/z$ -forhold (Hoffmann & Stroobant, 2007). Blant de mest brukte masseanalysatorene er kvadrupol, ionefelle og «time-of-flight» (Haag, 2016). I denne oppgaven ble kvadrupol benyttet og denne beskrives nedenfor.

### Kvadrupol

Kvadrupol-analysatoren består av fire parallelle sylindriske stenger. De to parene av motstående stenger er påsatt lik, men motsatt DC-spenning som veksler fortløpende. I tillegg er stengene påsatt en radiofrekvens AC-spenning. Når ionene føres igjennom analysatoren er det AC-spenningen som fører ionene i z-retning, mens den vekslende DC-spenningen gir ionene en oscillerende bevegelse i x- og y-planet. Spenningsene stilles inn slik at kun ioner med et bestemt  $m/z$ -forhold får en stabil bevegelse og slipper igjennom analysatoren. De uønskede ionene derimot, får en ustabil oscillerende bevegelse som fører til at de kolliderer med stengene og utlades (Ho et al., 2003).

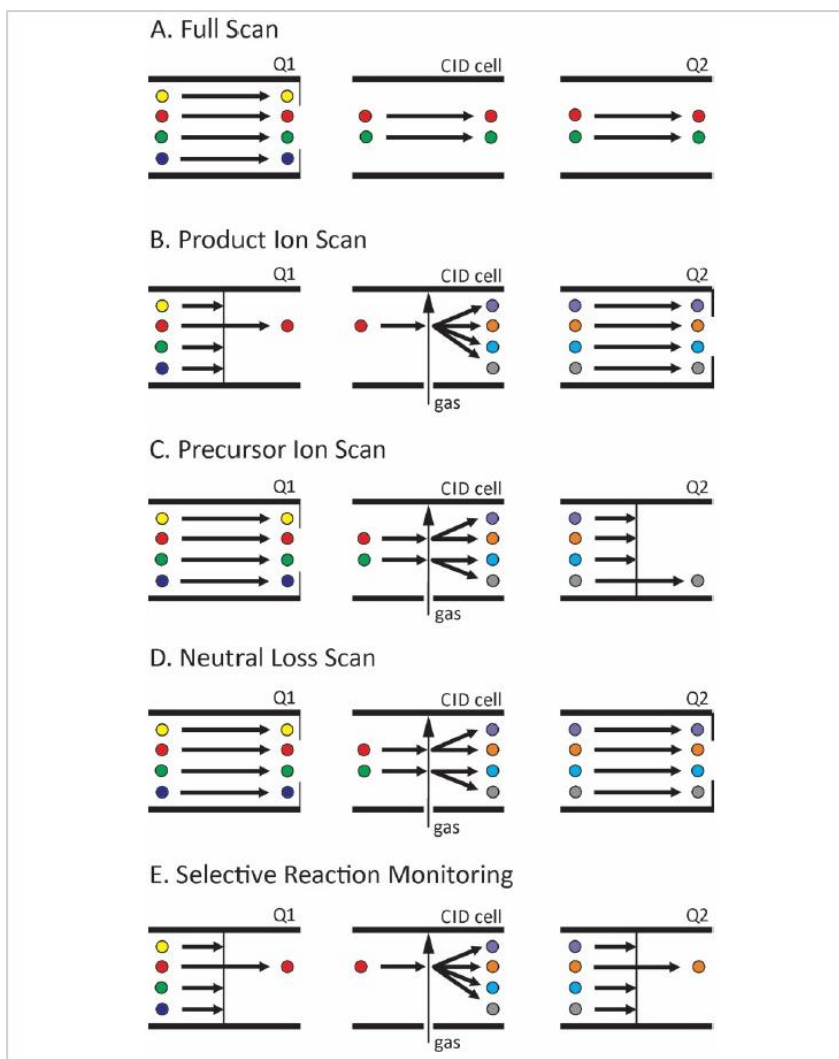


Figur 2.8: Kvadrupol. Gjengitt med tillatelse (Bergh, 2020).

## 2.5.5 Tandem massespektrometri

Når massespektrometri utføres med flere masseanalytatorer koblet sammen, kalles det tandem MS (MS/MS). Det er mange mulige sammensetninger av MS/MS, det kan f.eks. være kombinasjoner av kvadrupol, ionefelle og «time-of-flight». Innen rettskoksikologiske analyser av spesifikke analytter er tandem kvadrupol mye brukt (Remane et al., 2016). Den benyttes i denne oppgaven og beskrives i gjeldende kapittel.

Ved bruk av MS/MS kan det benyttes flere ulike skannmoduser (figur 2.9), dvs. innstillinger på hvilke ioner som slipper igjennom de aktuelle analysatorene.

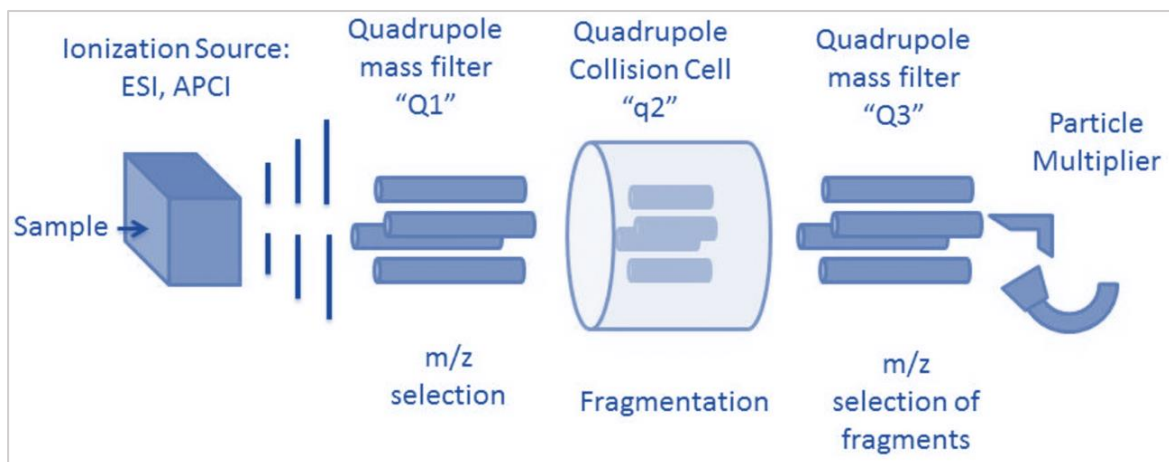


Figur 2.9: Ulike skannmoduser som kan benyttes ved MS/MS (Mbughuni et al., 2016), hvor Q1 og Q2 er masseanalytatorer og CID er en kollisjonscelle.

Ved kvantitative analyser ved MS/MS benyttes MRM som skannmodus (Remane et al., 2016). Det benyttes to spesifikke overganger per analytt, noe som gir forbedret sensitivitet ved å kun fokusere på ionet av interesse og støy fra andre forbindelser filtreres bort. Siden disse skann-modusene skanner etter kjente fragmenter av analytten, reduseres også sjansen for falske positive eller negative resultater.

## Tandem kvadrupol

Et tandem kvadrupol system (QqQ), også kalt trippel kvadrupol, består av tre kvadrupoler. Kvadrupolene er koblet lineært sammen og det er kun den første (Q1) og siste (Q3) som fungerer som masseanalytatorer, mens den midterste (q2) opptrer som en kollisjonscelle (figur 2.10). Molekylionene som velges i den første masseanalytatoren entrer kollisjonscellen som er påsatt radiofrekvensspenning og er fylt med en inert gass (f.eks. argon, helium eller nitrogen). Kollisjonscellen har i oppgave å akselerere de innkommende ionene slik at de kolliderer med den inerte gassen og fragmenterer. De resulterende fragmentionene entrer den siste masseanalytatoren hvor kun bestemte ioner ledes videre til detektoren.



Figur 2.10: Skjematisk fremvisning av en trippel kvadrupol (Milcah Jackson, 2015).

Forholdene i kollisjonscellen kan optimaliseres ved å endre spenningen som er påsatt cellen. Økt spenning resulterer i større grad av fragmentering og ulike fragmenter kan oppnås. I tillegg påvirkes fragmenteringsgraden av hvilken kollisjonsgass som benyttes; en tung gass som argon vil tilføre mer energi i kollisjonen og føre til større grad av fragmentering, enn f.eks. helium som er en mye lettere gass.

## 2.6 Metodevalidering

Validering innebærer utførelse av pålitelige eksperimenter som skal estimere effekten og påliteligheten til en analytisk metode. Hensikten er å gi objektiv dokumentasjon på om en metode er egnet for tiltenkt bruk og å identifisere begrensninger metoden kan ha under normale omstendigheter. De validerte parameterne representerer en metodes sanne prestasjon ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013). Validering skal gjennomføres når en ny metode skal innføres og når en eksisterende metode endres.

### 2.6.1 Valideringsparametere for kvantitative analyser

Parametere som bør valideres for kvantitative analyser er: kalibreringsmodell, presisjon, nøyaktighet, utbytte, stabilitet, overdraging, fortynningsintegritet, interferens, ME og deteksjons- og kvantifiseringsgrense ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013). Grunnet begrenset tid ble begrenset validering utført i denne oppgaven. De valideringsparametere som ble studert defineres nedenfor.

#### **Kalibreringsmodell**

Ved kvantitative analyser beregnes analyttkonsentrasjon ut ifra en kalibreringskurve som viser den matematiske sammenhengen mellom respons (f.eks. forholdet mellom topparealet til analytt og IS) og analyttkonsentrasjon. Kalibreringsmodellen kan være lineær eller kvadratisk.

#### **Presisjon og nøyaktighet**

Presisjon beskriver variasjonen for beregnede resultater i et datasett og betegnes med RSD.

Nøyaktighet beskriver avviket mellom beregnede resultater for målt og sann verdi og betegnes med BIAS.

## Utbytte

Ved prøveopparbeidelse kan noe analytt gå tapt og utbytte er den andelen som utvinnes. Utbytte er forholdet mellom analyttrespons fra et prøvesett hvor analytt tilsettes før prøveopparbeidelse og et hvor analytt tilsettes etter.

## Stabilitet

Stabilitet er analyttens evne til å motstå kjemisk forandring i matriks ved spesifikke lagringsforhold over tid. Det kan være avgjørende å ha kunnskap om hvor lang tid det kan gå mellom prøvetaking eller prøveopparbeidelse og analyse uten at dette påvirker deteksjon, identifikasjon eller kvantifisering. Det kan også være aktuelt å analysere prøven på nytt ved et senere tidspunkt. Da må man ha kontroll på hvor lenge analytt er stabil og hvilke lagringsbetingelser som gir tilstrekkelig stabilitet i forhold til kravene som stilles det aktuelle laboratoriet.

## 2.7 Kunnskapstilstand

Flere LC-MS-metoder har blitt utviklet for bestemmelse av tryptaminer. For analyse av tryptaminer i blod finnes det metoder som benytter LLE ((Meyer et al., 2014), (Fagiola et al., 2018), (Tanaka et al., 2006), (Sklerov et al., 2005)), PPT ((Adamowicz & Tokarczyk, 2016), (Shen et al., 2009), (Vaiano et al., 2016)), SPE (Wohlfarth et al., 2010) eller tørkede blodflekker (Ambach et al., 2014). Blant disse er det metoden av Meyer et al. som inkluderer flest tryptaminer. Metoden kan detektere 37 tryptaminer i plasma ved LC-MS/MS etter LLE. En metode utviklet av Adamowicz et al. benytter PPT før analyse med LC-MS/MS og kan detektere 143 stoffer, hvorav 18 er tryptaminer (Adamowicz & Tokarczyk, 2016). De andre metodene inkluderer et mindre antall tryptaminer. Tryptaminer som denne oppgaven inneholder, men som er fraværende i nevnte metoder er: Tryptamin, N,N-DMT-N-Oksid, 4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-AcO-DET, 4-OH-EPT, EPT og 5-MeO-EPT.

Litteraturen for stabiliteten til tryptaminer ser ut til å være begrenset, ut ifra hva jeg har klart å



finne. Det kommer derimot frem at stabiliteten ikke kan generaliseres for alle tryptaminer. Forsøk utført av Soh og Elliot viser at konsentrasjonen av  $\alpha$ -metyltryptamin (AMT) i blod, oppbevart i romtemperatur, har en fallende trend fra første dag, mens 5-MeO-DALT er stabil i minst 21 dager (Soh & Elliott, 2014). Studien av Meyer et al. viser at 35 tryptaminer, deriblant MiPT, DPT, 5-MeO-DPT, 4-OH-MiPT, 4-OH-DiPT, 4-OH-MET og 4-AcO-DiPT, er stabile i ekstrakter av blod ved 8 °C i 48 timer og i metanolløsninger i minst fire uker. 4-OH-DMT, 5-OH-DMT og DMT oppfylte ikke disse kravene. Meyer et al. hevder også at bruk av DMSO som løsemiddel og askorbinsyre som konserveringsmiddel vil forlenge analyttens holdbarhet. En studie utført av Martin et al. viser at 4-OH-DMT og 5-OH-DMT gir akseptable resultater for frys-tin-stabilitet og langtidsstabilitet i serum i seks uker ved -20°C (Martin et al., 2013).

## 3. Eksperimentelt

### 3.1 Kjemikalier og materialer

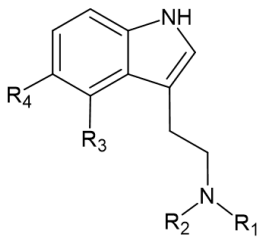
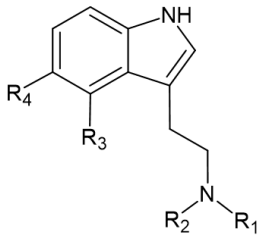
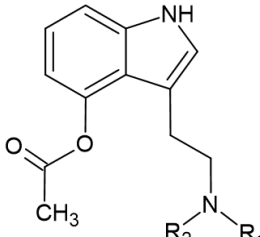
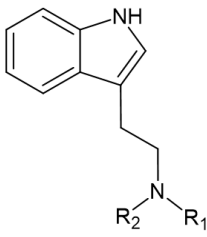
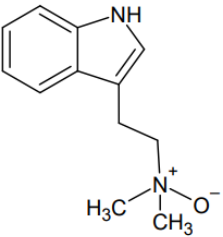
#### 3.1.1 Analytter og kjemikalier

Forbindelsene 4-AcO-DET, 4-AcO-MET, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-EPT, 4-OH-MET, 4-OH-MiPT og N,N-DMT-N-Oksid er fra Chiron AS (Trondheim, Norge). Forbindelsene 4-AcO-DMT, 4-AcO-DiPT, 4-MeO-DMT, 5-MeO-DiPT, 5-MeO-DMT, 5-MeO-DPT, 5-MeO-EPT, 5-OH-DMT, EPT, MET og MiPT er anskaffet fra Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, USA). Forbindelsen tryptamin er anskaffet fra Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA) og DMT fra Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Analyttenes navn er vist i tabell 3.1 og strukturer er vist i tabell 3.2.

Tabell 3.1: Navn og molekylformel tilhørende de 21 tryptaminene oppgaven omhandler.

Molekylformel	Navn
4-OH-DMT	Tetrahydroksidimetyltryptamin
5-OH-DMT	Pentahydroksidimetyltryptamin
4-OH-MET	Tetrahydroksimetyletyltryptamin
4-OH-DET	Tetrahydroksidietyltryptamin
4-OH-MiPT	Tetrahydroksimetylisopropanyltryptamin
4-OH-EPT	Tetrahydroksietylpropanyltryptamin
4-MeO-DMT	Tetrametoksidimetyltryptamin
5-MeO-DMT	Pentametoksidimetyltryptamin
5-MeO-EPT	Pentametoksietylpropanyltryptamin
5-MeO-DPT	Pentametoksidipropanyltryptamin
5-MeO-DiPT	Pentametoksideisopropanyltryptamin
4-AcO-DMT	Tetraacetoksidimetyltryptamin
4-AcO-MET	Tetraacetoksimetyletyltryptamin
4-AcO-DET	Tetraacetoksidietyltryptamin
4-AcO-DiPT	Tetraacetoksideisopropanyltryptamin
Tryptamin	Tryptamin
DMT	Dimetyltryptamin
MET	Metyletyltryptamin
MiPT	Metylisopropanyltryptamin
EPT	Etylpropanyltryptamin
N,N-DMT-N-Oksid	N,N-Dimetyltryptamin-N-Oksid

Tabell 3.2: Molekylstruktur og molekylformel tilhørende de 21 tryptaminene oppgaven omhandler.

Molekylstruktur	Analytt	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
	4-OH-DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H
	5-OH-DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OH
	4-OH-MET	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
	4-OH-DET	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
	4-OH-MiPT	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
	4-OH-EPT	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	H
	4-MeO-DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
	5-MeO-DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
	5-MeO-EPT	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
	5-MeO-DPT	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
	5-MeO-DiPT	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>
	4-AcO-DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
	4-AcO-MET	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	4-AcO-DET	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	4-AcO-DiPT	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>		
	Tryptamin	H	H		
	DMT	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		
	MET	CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	MiPT	CH <sub>3</sub>	CHCH <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>		
	EPT	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		
	N,N-DMT-N- Oksid				

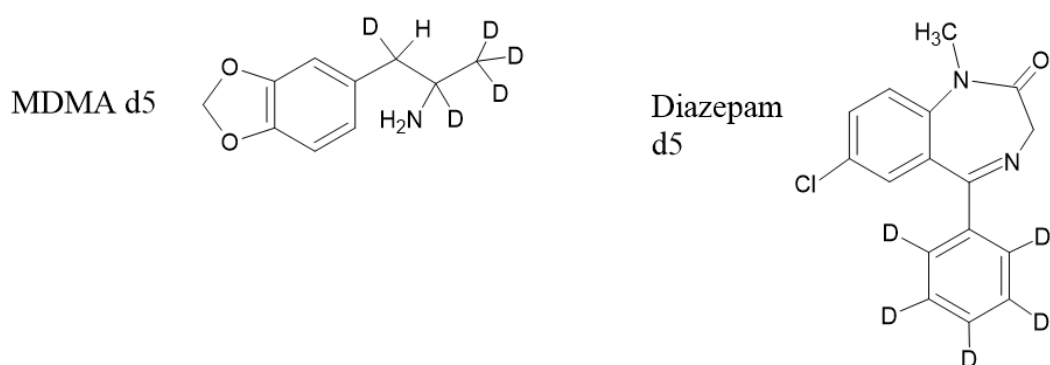
Benyttede kjemikalier var acetonitril og metanol kjøpt fra Merck (Darmstadt, Tyskland), ammoniumformat, maursyre og heptan kjøpt fra Prolab (Briare, Frankrike). Etylacetat var

anskaffet fra VWR International AS (Oslo, Norge) og di-natriumtetraborat-10-hydrat fra Chemi-Teknik A/S (Oslo, Norge). Ionebyttet vann fra et Milli-Q-filtreringssystem produsert av Millipore (Burlington, MA, USA) ble benyttet. Fullblod ble anskaffet fra blodbanken ved OUS (Oslo, Norge) og var tilsatt 2 g natriumfluorid, 6 mL heparin og 10 mL vann per 450 mL blod.

### 3.1.2 Internstandard (IS)

IS ble laget ved fortykning av stamløsninger av 0,684 mM diazepam d<sub>5</sub> (Cerilliant Corp., Round Rock, TX, USA) og 1,04 mM MDMA d<sub>5</sub> (Lipomed, Cambridge, MA, USA) i metanol med 25 mM maursyre. Ved stabilitetsforsøket av tryptaminer i renstoffløsning ble 10 µM IS benyttet, mens ved stabilitetsforsøket av tryptaminer i blod ble 0,5 µM IS benyttet.

Konsentrert IS og 10 µM IS-bruksløsning ble oppbevart ved -20 °C, mens 0,5 µM IS-bruksløsning ble oppbevart ved 4 °C.



Figur 3.1: Molekylstrukturer for internstandardarene MDMA d<sub>5</sub> og diazepam d<sub>5</sub>.

### 3.1.3 Utstyr

For inndamping ble Turbovap fra Biotage (Uppsala, Sverige) benyttet. Multivortexer kjøpt fra VWR International AS (Oslo, Norge) og vortexer fra Heidolph Instruments (Schwabach, Tyskland) ble benyttet for å blande prøver og sentrifuge produsert av Beckman Coulter (Brea, CA, USA). Automatpipette, pipetter og pipettespisser anskaffet fra Eppendorf (Hamburg, Tyskland) og Thermo Scientific (Waltham, MA USA) ble benyttet. Autosamplervialer i plast med snap-cap korker og blanke glassvialer med skrukorker fra Waters (Milford, MA, USA)

ble benyttet. Spisse plastrør (5 mL) og plastkorker var anskaffet fra Sarstedt (Nümbrecht, Tyskland). Spisse glassrør (5 mL) var anskaffet fra Apodan (Hoersholm, Danmark).

## 3.2 Tillaging av løsninger

### 3.2.1 Bruks-, standard- og kontrolløsninger

Ved analyse av de 21 tryptaminene i renstoffløsning med UHPLC-MS/MS var det enkelte tryptaminer som ikke ble tilstrekkelig separert, disse var 4-AcO-DMT, 4-OH-DET, 4-OH-EPT og N,N-DMT-N-Oksid. I tillegg var det blant de 21 tryptaminene fire par av strukturisomere. Disse har samme molekylformel og derav samme masse, men ulik strukturell konnektivitet. Disse kan separeres fra hverandre hvis de har spesifikke overganger som er ulike og/eller ved kromatografisk separasjon. Isomerparene med to like overganger var 4-MeO-DMT og 5-MeO-DMT, og 5-MeO-DPT og 5-MeO-DiPT. Disse var dermed avhengige av kromatografisk separasjon. 4-OH-DET og 4-OH-MiPT har en felles overgang og en som er spesifikk for 4-OH-MiPT, mens 4-OH-DMT og 5-OH-DMT har to ulike overganger og kan separeres. Isomerene og tryptaminene med utilstrekkelig separasjon, ble fordelt i hver sin blanding, blanding 1 og 2. Resterende tryptaminer ble også fordelt imellom disse blandinger på grunnlag av retensjonstider i renstoffløsning. På denne måten ble det mulig å studere koeluerende forbindelser uten at de påvirket hverandre. Tabell 3.3 viser fordelingen av tryptaminene i blanding 1 og 2.

Tabell 3.3: Kvalitativ oversikt over «Blanding 1» og «Blanding 2».

Blanding 1	Blanding 2
4-AcO-DiPT	4-AcO-DET
4-AcO-MET	4-AcO-DMT
4-OH-DET	4-MeO-DMT
5-MeO-DPT	4-OH-EPT
5-MeO-DMT	4-OH-DMT
5-OH-DMT	4-OH-MET
EPT	4-OH-MiPT
N,N-DMT-N-Oksid	5-MeO-EPT
MiPT	5-MeO-DiPT
Tryptamin	DMT
	MET

For studiene av stabiliteten av tryptaminer i renstoffløsninger ble bruksløsninger på 10 µM av ett og ett tryptamin hver for seg laget i løsningsmiddel angitt av produsent (Vedlegg 1: Konsentrasjon og løsemiddel for 21 tryptaminer). Den nødvendige mengden av konsentrert tryptamin ble beregnet ved bruk av fortynningsformelen vist nedenfor:

$$c_1V_1 = c_2V_2 \quad (2)$$

For studien av stabiliteten av tryptaminer i blod ble det laget ett sett av standarder (0,05, 0,25, 0,5, 0,75 og 1 µM) og kontroller (0,1 og 0,8 µM) for hver blanding av tryptaminer (Tabell 3.3). Disse ble laget ut ifra bruksløsningene på 10 µM av ett og ett tryptamin hver for seg. Formel 1 ble benyttet for beregning av nødvendig mengde av bruksløsningene (10 µM), og beregnet mengde av hvert tryptamin ble pipettert over i målekolben (5 mL) for blanding 1/ blanding 2 og fortynnet med 25 mM maursyre.

Konsentrerte tryptaminløsninger og bruksløsninger (10 µM) ble oppbevart ved -20 °C, mens standard- og kontrolløsninger ble oppbevart ved 4 °C.

### 3.2.2 Blank

Ved bruk av blanke prøver med og uten IS kan man kontrollere at det ikke er forhold ved analysen som gir opphav til bidrag for analytter eller IS.

I stabilitetsforsøket med tryptaminer i renstoffløsning ble 25 mM maursyre benyttet som blank, mens for forsøkene med tryptaminer i blod ble 100 µL fullblod preparert med enten PPT eller LLE benyttet som blank.

### 3.2.3 Buffer til UHPLC-analyse

En 100 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 ble laget ved at 12,6 g ammoniumformat ( $\text{HCO}_2\text{NH}_4$ , 63,06 g/mol) ble veid i en 2 L flaske og Milli-Q-vann ble tilsatt til totalvolumet ble 2 L. Justering av pH ble utført ved tilsetning av ca. 25 mL konsentrert maursyre. Bufferløsningen ble fortynnet til 10 mM ved tilsetning av Milli-Q-vann og kunne deretter benyttes til analyse med UHPLC.

## 3.3 Instrumentelt

### 3.3.1 Instrumentelle betingelser

Instrumentet som ble benyttet var produsert av Waters Corp. (Milford, MA, USA) og bestod av en Acquity UPLC- og en Xevo TQS-modul. Kromatografisk separasjon ble utført i en Kinetex bifenyl-kolonne (2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm partikler) fra Phenomenex (Torrance, CA, USA) med kolonnetemperatur på 60 °C, MF bestående av 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B) og MF-hastighet på 0,5 mL/min. Autosampleren (Waters ACQUITY FTN) benyttet injiseringsvolum 1,5 µL. Benyttet gradient brukte 7,5 min. og vises i tabell 3.4. Det ble benyttet ESI i positiv modus og med MRM som skannmodus. Betingelser benyttet for MS/MS er vist i tabell 3.5.



Tabell 3.4: Benyttet gradient av 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B) i MF ved separasjon med UHPLC.

Konsentrasjon (% A)	97,5	97,5	75,0	74,0	65,0	65,0	50,0	0,00	0,00	97,5	97,5
Konsentrasjon (% B)	2,5	2,5	25,0	26,0	35,0	45,0	50,0	100,0	100,0	2,5	2,5
Tid (min)	0,00	0,20	0,30	2,00	2,10	3,10	5,20	5,30	7,00	7,10	7,50

Tabell 3.5: Benyttede MS/MS-betingelser.

<b>Detektor</b>	
Multiplikatorspenning (V)	520,63
<b>MS-kilde</b>	
Kapillærspenning (kV)	1
Oppløsningsgassstemperatur (°C)	500
Oppløsningsgasshastighet (L/t)	1000
Conespenning (V)	MRM-spesifikk
Conegasshastighet (L/t)	300
Kildetemperatur (°C)	150

## 3.4 Metodeutvikling

### 3.4.1 Optimalisering av MRM-overganger

Benyttede MS-parametere er vist i tabell 3.5. Analytt (1  $\mu$ M) fortynnet i ionebyttet vann ble innført direkte inn i MS/MS-en vha. en sprøytepumpe. Ulike conespenninger (fra 10 til 35 V) og kollisjonsenergi (fra 10 til 45 eV) ble trinnvis testet for å oppnå optimale forhold for fragmentering for hver enkelt analytt. Benyttet dwelltid var 0,004 sek. for alle tryptaminene, bortsett fra for 4-AcO-DiPT, 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT hvor dwelltid på 0,011 sek. ble benyttet. Tabell 3.6 viser to valgte MRM-overganger for hver analytt, i tillegg til molekylvekt og benyttede instrumentelle spesifikasjoner. Tabellen viser også massene og ioneovergangene til forbindelsene benyttet til IS. Benyttede masser er ikke monoisotopiske, men direkte avleste

fra instrumentet ved utført optimalisering av MRM-overganger.

Tabell 3.6: Analytter og IS med spesifikke MRM-overganger og MS-betingelser.

Forbindelse	Molekylion ( <i>m/z</i> )	Produktion ( <i>m/z</i> )	Cone- spenning (V)	Kollisjons- energi (eV)
Tryptamin	161.10	91.00	15	35
	161.10	144.00	15	20
DMT	188.75	116.83	20	30
	188.75	143.91	20	15
MET	203.00	71.88	25	15
	203.00	143.91	25	20
4-OH-DMT	205.00	132.00	20	25
	205.00	142.00	20	30
5-OH-DMT	205.10	58.00	20	40
	205.10	160.00	20	25
4-OH-MET	218.75	71.91	30	15
	218.75	141.89	30	30
5-MeO-DMT	219.10	58.00	20	40
	219.10	174.00	20	20
4-MeO-DMT	219.10	58.00	20	40
	219.10	174.00	20	20
4-OH-DET	232.80	131.75	25	30
	232.80	159.71	25	20
4-AcO-DMT	246.81	114.82	25	40
	246.81	201.98	25	15
4-OH-EPT	247.10	100.19	20	20
	247.10	132.00	20	30
4-AcO-MET	261.06	71.88	25	15
	261.06	159.88	25	25
4-AcO-DET	274.75	85.85	25	30
	274.75	85.85	25	30

N,N-DMT-N-Oksid	205.00	117.00	20	30
	205.00	144.00	20	20
4-AcO-DiPT	303.00	114.00	20	20
	303.00	160.00	20	20
5-MeO-DiPT	275.20	114.10	25	15
	275.20	174.10	25	20
5-MeO-DPT	275.20	114.00	25	20
	275.20	174.00	25	25
5-MeO-EPT	262.00	100.00	20	20
	262.00	175.00	20	20
4-OH-MiPT	233.00	86.00	20	15
	233.00	160.00	20	20
EPT	231.00	100.00	20	20
	231.00	144.00	20	20
MiPT	217.00	86.00	20	20
	217.00	144.00	20	20
Diazepam d <sub>5</sub>	290.10	198.10	40	30
MDMA d <sub>5</sub>	199.20	165.10	35	10

### 3.4.2 Evaluering av UHPLC-kolonner

Separasjonsevnen til tre ulike UHPLC-kolonner, BEH C18, Kinetex bifenyyl og HSS T3, med samme dimensjoner (2,1 x 100 mm) ble undersøkt ved analyse av en løsning av tryptaminer. Løsningen bestod av 14 tryptaminer (4-AcO-DET, 4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-MeO-DMT, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-EPT, 4-OH-MET, 5-MeO-DMT, 5-OH-DMT, DMT, MET, N,N-DMT-N-Oksid og tryptamin) som alle hadde en konsentrasjon på 1 µM og var fortynnet i Milli-Q-vann. Syv ekstra tryptaminer ble mottatt på et senere tidspunkt. UHPLC-kolonnene ble testet ved like instrumentelle betingelser, med unntak av benyttet kolonnetemperatur, som var 60 °C for BEH C18- og kinetex bifenyyl-kolonnen 65 °C for HSS T3, selv om produsenten (Waters Corp.) anbefaler en øvre temperaturgrense på 45 °C. Det ønskes generelt en høy temperatur, da dette fører til hurtigere separasjon, bedre oppløsning og forbedret toppform. I tillegg har langvarig erfaring ved Avdelingen for rettsmedisinske fag vist at kolonnen tåler 65 °C.

MF bestod av 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B) og det ble benyttet en lineær gradient på 7 min. vist i tabell 3.7. MF-hastigheten ble satt til 0,6 mL/min. Bortsett fra nevnte betingelser, ble de instrumentelle betingelsene beskrevet i kapittel 3.3.1 benyttet.

Tabell 3.7: Benyttet gradient ved evaluering av UHPLC-kolonnene (2,1 x 100 mm) BEH C18, Kinetex bifenyl og HSS T3. Konsentrasjon (% A) og (% B) viser hvor stor andel av MF som ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B).

Konsentrasjon (% A)	95,0	95,0	75,0	5,0	5,0	95,0	95,0
Konsentrasjon (% B)	5,0	5,0	25,0	95,0	95,0	5,0	5,0
Tid (min)	0,00	0,30	5,00	5,10	6,00	6,01	7,0

### 3.4.3 Optimalisering av gradienter

En 1 µM løsning av 21 tryptaminer fortynnet i Milli-Q-vann ble analysert på UHPLC-MS/MS med Kinetex bifenyl-kolonne (2,1 mm x 100 mm, 1,8 µm partikler) og injeksjonsvolum 3 µL.

Optimalisering av gradient ble utført for å oppnå tilstrekkelig separasjon i løpet av en kort tid.

### 3.4.4 Kapillærspenning – Påvirkning på respons

En 1 µM løsning av 14 tryptaminer (4-AcO-DET, 4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-MeO-DMT, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-EPT, 4-OH-MET, 5-MeO-DMT, 5-OH-DMT, DMT, MET, N,N-DMT-N-Oksid, Tryptamin) fortynnet i Milli-Q-vann ble analysert på UHPLC-MS/MS med BEH C18-kolonne (2,1 x 100 mm) og gradient vist i tabell 3.7. Benyttet injeksjonsvolum var 3 µL. Tre kapillærspenninger ble testet (0,5, 1,0 og 1,5 kV) og analysen ble utført med tre replikater. Bortsett fra nevnte spesifikasjoner, ble instrumentelle betingelser beskrevet i kapittel 3.3.1 benyttet. Responsen tilhørende analytt ble studert i MassLynx.

### 3.4.5 MF-startkonsentrasjon – Påvirkning på retensjon på kolonnen

En løsning bestående av 21 tryptaminer (0,8  $\mu$ M) i 25 mM maursyre ble analysert med UHPLC-MS/MS med gradient av to ulike startkonsentrasjoner av MF, den ene begynte med 95,0 % 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og 5,0 % metanol (B) og den andre med 97,5 % A og 2,5 % B. For begge startkonsentrasjonene av MF ble det benyttet to ulike gradienter, gradient 1 og 2 (vist i tabell 3.8). Gradient 2 er forskjøvet ett minutt i forhold til gradient 1. Hver analyse ble utført med tre replikater. Bortsett fra nevnte spesifikasjoner ble instrumentelle betingelser vist i kapittel 3.3.1 benyttet. Tryptaminenes  $R_T$  ble undersøkt i MassLynx.

Tabell 3.8: Gradient 1 og 2 benyttet for testing av påvirkningen MF-startkonsentrasjonen hadde på retensjonen på kolonnen. MF bestod av 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B). Konsentrasjon (% B) representerer andelen av metanol (B) i MF, og tiden er i minutter.

Gradient	Konsentrasjon (% B)										
	5,0 / 2,5	5,0 / 2,5	25,0	26,0	35,0	45,0	50,0	100,0	100,0	5,0	5,0
1	0,00	0,20	0,30	2,00	2,10	3,10	5,20	5,30	7,00	7,10	7,50
2	0,00	1,30	1,30	3,00	3,10	4,10	6,20	6,30	8,00	8,10	8,50

## 3.5 Prøveopparbeidelse

### 3.5.1 Proteinfelling (PPT)

Fullblod og alle bruksløsninger ble temperert til romtemperatur. 100  $\mu$ L fullblod ble pipettert til spisse plastrør (5 mL) for alle blank-, kontroll-, standard- og analyttløsninger. Bruksløsninger av analytt ble vortexet før 50  $\mu$ L ble pipettert til tilhørende plastrør for analyttløsninger.

Alle løsningene ble tilsatt 500  $\mu$ L acetonitril: metanol (85:15, v/v), før de ble korket og ristet

med en hastighet på 2500 rpm. i 1 minutt på multivortexer. Prøvene ble satt i fryser i 10 minutter og sentrifugert i 10 minutter ved 4 °C og 4500 rpm. Supernatanten ble helt over i nye spisse plastrør (5 mL) og 15 µL konsentrert maursyre ble tilsatt. Kontroll-, standard- og analyttløsninger ble tilsatt 50 µL IS, mens blankprøven ble tilsatt 50 µL milli-Q-vann for at samme volum skulle oppnås. Alle prøvene ble ristet i 1 min. ved 2000 rpm. og 50 µL av prøvene ble pipettert over i autosamplerglass (i plast). 150 µL 5 mM ammoniumformat-buffer pH 3,1: metanol (97:3, v:v) ble tilsatt og autosamplerglassene ble korket, ristet og analysert på UHPLC-MS/MS.

### 3.5.2 Væske-væske-ekstraksjon (LLE)

Fullblod og alle bruksløsninger ble temperert til romtemperatur. 100 µL fullblod ble pipettert til spisse plastrør (5 mL) for alle blank-, kontroll-, standard- og analyttløsninger.

Bruksløsninger av analytt ble vortexet før 50 µL ble pipettert til tilhørende plastrør for analyttløsninger.

Alle løsningene ble tilsatt 75 µL karbonatbuffer pH 9,3 og ristet i 1 minutt ved 2000 rpm. på multivortexer. 1,2 mL av 80 % etylacetat:heptan (80:20, v/v) i 20 % IPA ble tilsatt. Prøvene ble korket og ristet i 10 minutter ved 2500 rpm. og sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm. i 10 minutter, før 750 µL organisk fase ble pipettert i nye glassrør. Kontroll-, standard- og analyttløsninger ble tilsatt 50 µL IS, mens blankprøven ble tilsatt 50 µL milli-Q-vann for at samme volum skulle oppnås. Prøvene ble dampet inn til tørrhet ved 40 °C og 5 psi på TurboVap og reløst i 69 µL 10 mM ammoniumformatbuffer (pH 3,1): metanol (9:10, v/v). Alle prøvene ble ristet i 1 min. ved 2500 rpm. og pipettert over i autosamplerglass (i plast) som ble korket og analysert på UHPLC-MS/MS.

## 3.6 Stabilitetsstudie

Stabilitetsstudien ble planlagt og gjennomført for å inkludere situasjoner som normalt kan forekomme i rutinedriften, samt for å kartlegge tryptaminenes oppbevaringskrav. Studien ble utført med 21 tryptaminer (tabell 3.5) i renstoffløsning og blod, oppbevart i romtemperatur, kjøleskap (4-6 °C) og fryser (-20 °C). Ved forsøksstart ble prøvene analysert vha. UHPLC-

MS/MS med gitte betingelser (kapittel 3.3) for at analyttens utgangsrespons skulle fastslås. Analysen ble gjentatt ved bestemte dager og responsen ble undersøkt over tid for kartlegging av stabiliteten.

### 3.6.1 Stabilitet i renstoffløsninger

Ved forsøksstart (dag null) ble tre replikater på 8  $\mu\text{L}$  av hvert tryptamin (10  $\mu\text{M}$ ) (beskrevet i kapittel 3.1.1) pipettert til autosamplervialer og tilsatt 8  $\mu\text{L}$  IS (10  $\mu\text{M}$ ). Prøvene ble fortynnet med 200  $\mu\text{L}$  25 mM maursyre. Vialene ble korket, ristet og analysert med UHPLC-MS/MS.

Renstoffløsning (10  $\mu\text{M}$ ) av hvert tryptamin ble fordelt i fire blanke glassvialer med skrukork og plassert til fire ulike oppbevaringsforhold. En vial ble plassert i fryser, en i kjøleskap, og to i romtemperatur; en til oppbevaring lyst og en mørkt. Vialen som skulle stå lyst ble plassert på arbeidsbenken i laboratoriet, mens vialen som skulle oppbevares mørkt ble plassert i en lukket boks av papp.

Etter tre dager ble glassvialene oppbevart i romtemperatur hentet fram og prosedyren fra dag null ble gjentatt for tre replikater fra hver vial. Glassvialene ble plassert tilbake til sitt tidligere oppbevaringsforhold til neste analysedag. Etter 14 dager ble alle glassvialene hentet frem fra sine oppbevaringsforhold og tillatt romtemperering, før prosedyren fra dag null ble gjentatt for tre replikater fra hver lagringsbetingelse.

### 3.6.2 Stabilitet i blod

Tre stabilitetsprøver for hver analyttløsning (0,1 og 0,8  $\mu\text{M}$  av blanding 1 og 2) ble laget av 1800  $\mu\text{L}$  fullblod og 900  $\mu\text{L}$  analyttløsning i 5 mL spisse plastrør. Stabilitetsprøvene ble laget med hver sin type blod. Stabilitetsprøvene ble ristet i 1 min. ved 2000 rpm. og 600  $\mu\text{L}$  ble pipettert til tre nye plastrør (5 mL) som ble korket og satt til oppbevaring i romtemperatur, kjøleskap og fryser.

Ved forsøksstart (dag null) ble det pipettert ut 100  $\mu\text{L}$  av hver stabilitetsprøve over i nye spisse plastrør (5 mL). To replikater av kontrolløsninger ble laget ved at 50  $\mu\text{L}$  analyttløsning

(0,1 og 0,8  $\mu\text{M}$  av blanding 1 og 2) og 100  $\mu\text{L}$  fullblod ble pipettert til 5 mL spisse plastrør. Standardløsninger ble laget ved at 50  $\mu\text{L}$  analyttløsning (0,05, 0,25, 0,5, 0,75 og 1  $\mu\text{M}$ ) og 100  $\mu\text{L}$  fullblod ble pipettert til 5 mL spisse plastrør. Blankløsninger ble tilsatt 100  $\mu\text{L}$  fullblod i 5 mL spisse plastrør. Det ble benyttet samme type fullblod i blank-, kontroll- og standardløsninger. Deretter ble fremgangsmåten for PPT (kapittel 3.5.1) utført på alle stabilitetsprøver, blank-, kontroll- og standardløsninger før de ble analysert med UHPLC-MS/MS. Stabilitetsprøvene ble plassert tilbake til sine bestemte lagringsbetingelser.

På dag en (første dag etter forsøksstart), syv og 14 ble plastrørene hentet frem fra sine lagringsbetingelser og tillatt romtemperering, før fremgangsmåten fra dag null ble gjentatt. Stabilitetsprøvene ble plassert tilbake til sine bestemte lagringsbetingelser. Blank, standarder og kontroller ble ekstrahert på nytt hver analysedag.

## 3.7 Dataanalyse

Oppnådde resultater etter endt analyse med UHPLC-MS/MS ble analysert i MassLynx 4.1. Toppareal ble benyttet for beregning av respons og lineær standardkurve ble benyttet for kvantifisering av analytt.

## 3.8 Validering

### 3.8.1 Utbytte

Utbytte ble beregnet for PPT (kapittel 3.5.1) og LLE (kapittel 3.5.2) for de 21 tryptaminene i blanding 1 og 2 (tabell 3.3) ved to konsentrasjonsnivåer (0,04 og 0,8  $\mu\text{M}$ ). Det ble benyttet to prøvesett (prøvesett A og B) og tre replikater for hver analyttløsning.

Prøvesettene ble laget ved pipettering av 100  $\mu\text{L}$  fullblod til 5 mL spisse plastrør. Prøvesett A ble tilsatt 50  $\mu\text{L}$  analytt. Prøveopparbeidelse (kapittel 3.5.1/kapittel 3.5.2) ble deretter fulgt for alle prøvene. Etter proteinfelling/ekstraksjon og overføring av supernatant/organisk fase til nye spisse plastrør (5 mL) ble prøvesett B tilsatt 50  $\mu\text{L}$  analytt og



prøveopparbeidelsesmetoden ble fulgt videre for alle prøvene. Deretter ble prøvene analysert med UHPLC-MS/MS og resultatene ble tolket i MassLynx ved at forholdet mellom responsen til prøvesett A og B ble studert.

### 3.8.2 Mellom-serie-variasjon

For stabilitet av tryptaminer i blod ble det laget nye kontroller hver dag analysen skulle gjennomføres. Kontrollene ble laget med konsentrasjon 0,1 og 0,8  $\mu\text{M}$  for blanding 1 og 2. Det ble laget to replikater av hver kontroll. I prøveserien analysert med UHPLC-MS/MS ble blankløsninger analysert først, etterfulgt av en replikat av kontrollene, med lave kontroller først. Deretter ble alle standard- og stabilitetsløsninger analysert, etterfulgt av den andre replikaten av kontroller, men med høye kontroller først. Etter alle analysedagene var det totalt åtte replikater av hver kontroll, fordelt med to replikater av hver kontroll på hver serie, som hadde blitt analysert. Mellom-serie-variasjonen ble studert ved beregning av nøyaktighet (BIAS) og relativt standardavvik (RSD) for kontrolløsningene.

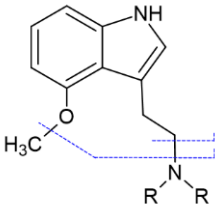
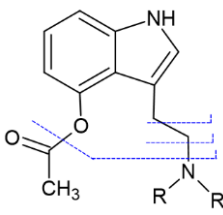
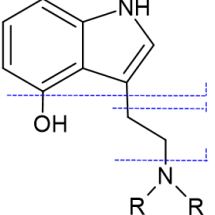
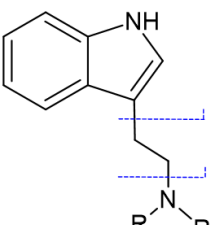
## 4. Resultater og diskusjon

### 4.1 Metodeutvikling

#### 4.1.1 Fragmenteringsmønster

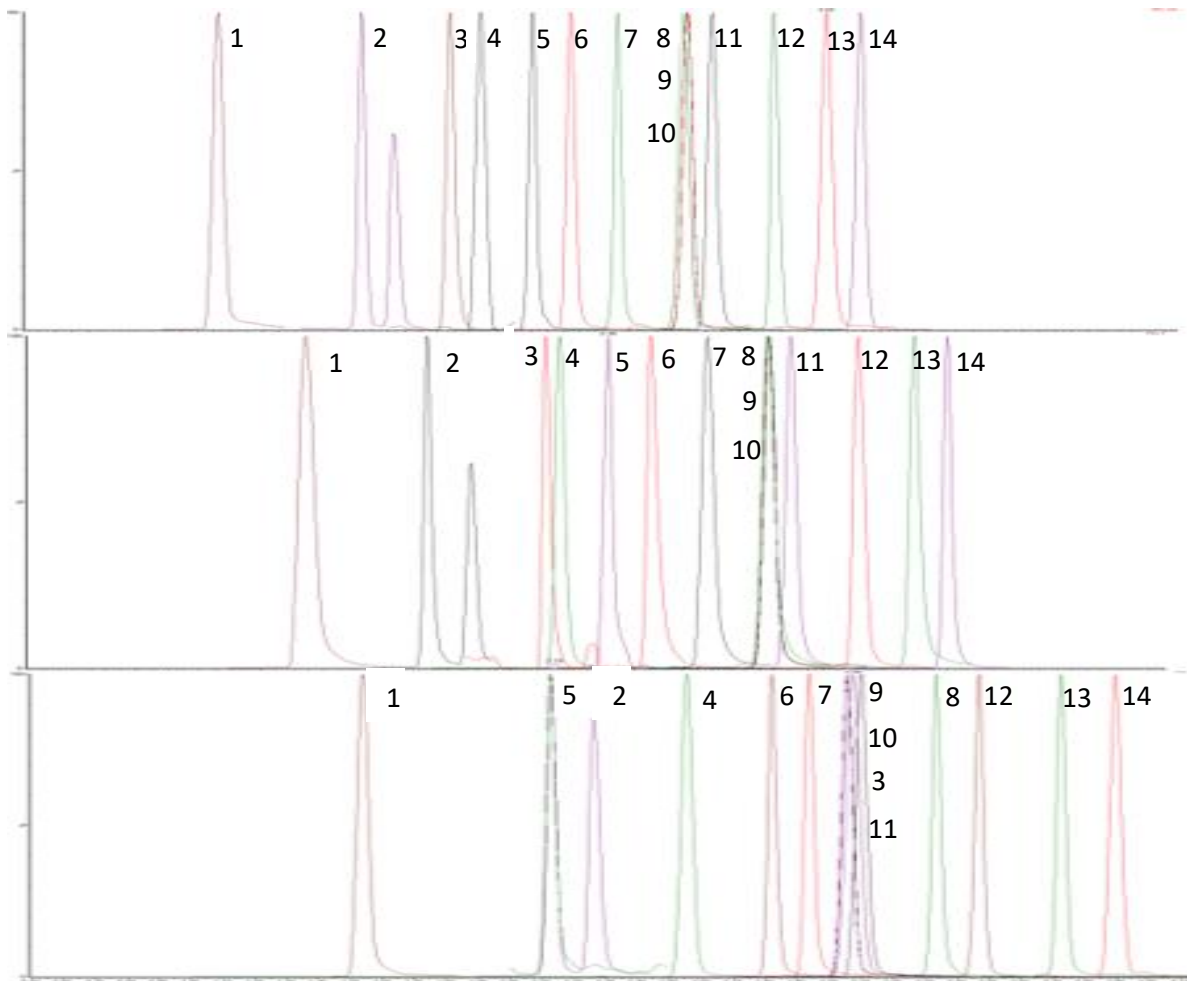
Ut ifra observerte produksjoner kan det antas at tryptaminer med samme generelle struktur har det samme fragmenteringsmønsteret. Tabell 4.1 viser antatt fragmenteringsmønster for flere generelle tryptaminstrukturer. Fragmenteringsmønsteret er lagd på bakgrunn av observerte produksjoner funnet ved optimalisering av MRM-overganger for 21 tryptaminer (kapittel 3.4.1)

Tabell 4.1: Antatt fragmenteringsmønster (stiplet linje) for flere generelle tryptaminstrukturer på grunnlag av observerte produksjoner ( $m/z$ ).

Molekylstruktur	Antatt molekylformel for produksjon	Observert produksjon ( $m/z$ )
	$C_{11}H_{12}NO^+$ $C_{10}H_9NO^+$	174 159
	$C_{11}H_{10}NO_2^+$ $C_{12}H_{12}NO_2^+$ $C_{10}H_9NO^+$	188 202 159
	$C_8H_5N^+$ $C_8H_6NO^+$ $C_{10}H_{10}NO^+$	115 132 160
	$C_8H_6N^+$ $C_{10}H_{10}N^+$	116 144

#### 4.1.2 Vurdering av UHPLC-kolonner

Tre UHPLC-MS/MS kolonner (BEH C18, kinetex bifenyl og HSS T3) ble evaluert for separasjon av 14 tryptaminer i renstoffløsning. Figur 4.1 viser separasjonsevnen oppnådd når samme instrumentelle betingelser, med unntak av kolonnetemperatur, ble benyttet. For BEH C18- og kinetex bifenyl-kolonnen ble 60 °C benyttet som kolonnetemperatur, mens for HSS T3-kolonnen ble den satt til 65 °C.



Figur 4.1: Sammenligning av UHPLC-kolonnene BEH C18 (øverst), HSS T3 (midten) og kinetex bifenyl (nederst), vist i form av kromatogram. Tiden på x-aksen går fra 0,5 til 4,1 minutter og de kromatografiske toppene er nummerert med tall fra 1 til 14, etter hvilket tryptamin de representerer. Tall og tilhørende tryptamin er som følger: 1) 5-OH-DMT, 2) 4-OH-DMT, 3) 4-OH-DET, 4) 4-OH-MET, 5) Tryptamin, 6) DMT, 7) 5-MeO-DMT, 8) MET, 9) 4-AcO-DMT, 10) 4-OH-EPT, 11) N,N-DMT-N-Oksid, 12) 4-AcO-MET, 13) 4-MeO-DMT, 14) 4-AcO-DET. Eksakte  $R_T$  er vist i vedlegg 2: Retensjonstider for tryptaminer for tre typer UHPLC-kolonner.

For 4-OH-DMT ble det observert to separate topper for alle de evaluerte kolonnene (Kromatografisk topp nr. 2 i figur 4.1). Når forbindelsen ble analysert alene derimot, ble kun den som eluerte sist av disse to observert. Dette burde undersøkes videre.

Retensjonsrekkefølgen for tryptaminene var lik ved kromatografisk separasjon med BEH C18- og HSS T3-kolonne (Figur 4.1, øverst og midten), men sistnevnte viste en bedre retensjonsevne. Som vist i figur 4.1, førte ikke disse kolonnene til tilstrekkelig separasjon av

4-AcO-DMT (topp nr. 9), 4-OH-EPT (topp nr. 10) og MET (topp nr. 8). Kromatografisk separasjon av de 14 tryptaminene med kinetex bifenyl-kolonnen resulterte i en annerledes retensjonsrekkefølge. Bifenyl-kolonnen var i tillegg den evaluerte kolonnen med best retensjonsevne som vist i figur 4.1, nederst. Denne kolonnen førte ikke til tilstrekkelig separasjon av 4-AcO-DMT (topp nr. 9), 4-OH-DET (topp nr. 3) og 4-OH-EPT (topp nr. 10). I tillegg hadde tryptamin (topp nr. 5) lik retensjonstid som den ene toppen tilhørende 4-OH-DMT (topp nr. 2).

Alle de tre evaluerte UHPLC-kolonnene, egnet seg til kromatografisk separasjon av tryptaminer, selv om det ikke var fullstendig separasjon av alle stoffene. Kolonnen som ble valgt var Kinetex bifenyl, da denne vurderes eventuelt for bruk til rutinedriften ved Avdeling for rettsmedisinske fag ved OUS.

#### 4.1.3 Kapillærspenning – Påvirkning på respons

Tre kapillærspenninger (0,5, 1,0 og 1,5 kV) ble evaluert for analyse av 14 tryptaminer i renstoffløsning med UHPLC-MS/MS. Oppnådde responser vist i tabell 4.2, er gjennomsnittlig verdi av tre replikater.

Tabell 4.2: Respons tilhørende analytt ved kapillærspenningene 0,5, 1,0, og 1,5 kV ved analyse med UHPLC-MS/MS. Høyest oppnådd respons for hver analytt er markert med blått.

Analytt	Kapillærspenning		
	0,5kV	1kV	1,5kV
4-AcO-DET	109589	135199	122630
4-AcO-DMT	47793	52168	49076
4-AcO-MET	260682	296996	282426
4-MeO-DMT	81265	76617	63734
4-OH-DET	12723	13923	13282
4-OH-DMT	5665	5759	5169
4-OH-EPT	32972	34315	30169
4-OH-MET	37253	39030	32909
5-MeO-DMT	65194	70036	61242
5-OH-DMT	21077	21423	18367
DMT	42739	39699	31488
MET	131886	115932	93324
N,N-DMT-N-Oksid	325495	320147	276926
Tryptamin	1691	1812	1744

Uttestingen av tre ulike kapillærspenninger ble kun utført på de 14 tryptaminene som var inkludert i oppgaven ved prosjektstart.

Sjansen for deteksjon av analytt øker med en høyere respons, da dette fører til en økt S/N-ratio. Fra tabell 4.2 kan man se at ti av 14 tryptaminer hadde høyest respons med kapillærspenning på 1,0 kV. Denne spenningen ble valgt for den instrumentelle metoden som ble utviklet.

#### 4.1.4 MF-startkonsentrasjon – Påvirkning på retensjon på kolonnen

To MF-startkonsentrasjoner (5 % og 2,5 % B) ble evaluert for kartlegging av påvirkningen denne hadde på kolonnens evne til å holde igjen analytt. Mobilfasen bestod av 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3,1 (A) og metanol (B). For begge startkonsentrasjonene av MF ble det benyttet to ulike gradienter, gradient 1 og 2, hvor gradient 2 var forskjøvet ett

minutt i forhold til gradient 1. Hver analyse ble utført med tre replikater.

Tabell 4.3: Oppnådde retensjonstider vist i minutter for 21 tryptaminer med MF med startkonsentrasjon på 5 % og 2,5 % metanol (B) ved gradient 1 og 2. Kolonnen «Differanse R<sub>T</sub>» viser differansen mellom R<sub>T</sub> ved de ulike gradientene. R<sub>T</sub> er gjennomsnittlig verdi av tre replikater.

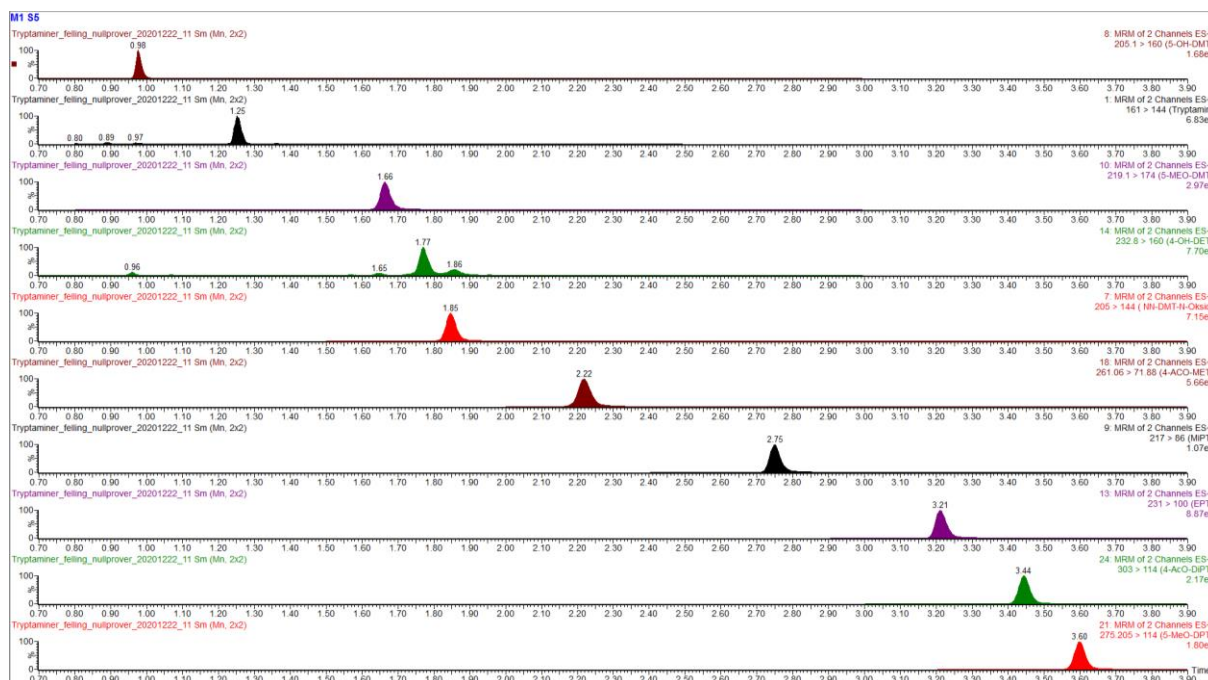
Analytt	5 % B		Differanse R <sub>T</sub>	2,5 % B		Differanse R <sub>T</sub>
	Gradient	Gradient		Gradient	Gradient	
	1	2		1	2	
4-AcO-DET	2,72	3,71	<b>0,98</b>	2,73	3,72	<b>0,99</b>
4-AcO-DMT	1,68	2,62	<b>0,94</b>	1,70	2,67	<b>0,97</b>
4-AcO-DiPT	3,42	4,41	<b>0,99</b>	3,42	4,42	<b>1,00</b>
4-AcO-MET	2,15	3,10	<b>0,95</b>	2,16	3,14	<b>0,98</b>
4-MeO-DMT	2,58	3,54	<b>0,95</b>	2,60	3,57	<b>0,98</b>
4-OH-DET	1,72	2,65	<b>0,93</b>	1,74	2,70	<b>0,97</b>
4-OH-DMT	1,12	2,02	<b>0,90</b>	1,14	2,08	<b>0,93</b>
4-OH-EPT	2,45	3,40	<b>0,95</b>	2,47	3,44	<b>0,98</b>
4-OH-MET	1,34	2,26	<b>0,92</b>	1,36	2,31	<b>0,95</b>
4-OH-MiPT	1,72	2,65	<b>0,93</b>	1,74	2,70	<b>0,96</b>
5-MeO-DMT	1,60	2,53	<b>0,93</b>	1,62	2,58	<b>0,96</b>
5-MeO-DiPT	3,57	4,56	<b>0,99</b>	3,57	4,57	<b>1,00</b>
5-MeO-DPT	3,50	4,49	<b>0,99</b>	3,50	4,49	<b>1,00</b>
5-MeO-EPT	3,16	4,15	<b>0,99</b>	3,16	4,16	<b>1,00</b>
5-OH-DMT	0,95	1,85	<b>0,90</b>	0,97	1,91	<b>0,95</b>
DMT	1,54	2,46	<b>0,91</b>	1,57	2,51	<b>0,95</b>
EPT	3,18	2,97	<b>-0,21</b>	3,18	3,64	<b>0,45</b>
MET	2,02	2,95	<b>0,93</b>	2,04	3,00	<b>0,96</b>
MiPT	2,71	3,69	<b>0,98</b>	2,72	3,71	<b>0,99</b>
N,N-DMT-N-Oksid	1,80	2,71	<b>0,91</b>	1,82	2,76	<b>0,95</b>
Tryptamin	1,21	2,07	<b>0,85</b>	1,24	2,13	<b>0,90</b>

Dersom differansen i R<sub>T</sub> for de to gradientene er 1 min. har analytten fullstendig retensjon på kolonnen, da dette samsvarer med tidsdifferansen mellom gradientene. I tabell 4.3 kan man se at det ble oppnådd mer fullstendig retensjon på kolonnen for alle tryptaminene når gradienten startet med 2,5 % metanol. Dette er ønskelig da man kan få et bedre skille mellom analytt og andre komponenter i MF, som f.eks. salter, og man i større grad kan velge når stoffene skal løsne fra kolonnen ved å øke mengden organisk i MF. Denne startkonsentrasjonen for MF ble dermed valgt for den instrumentelle metoden som ble utviklet.

I tabell 4.3 kan man se en avvikende  $R_T$  for EPT. Denne holdes ikke like godt igjen på kolonnen som de andre tryptaminene. Det ble allikevel ikke sett noe variasjon i  $R_T$  for EPT ved utført stabilitetsstudie.

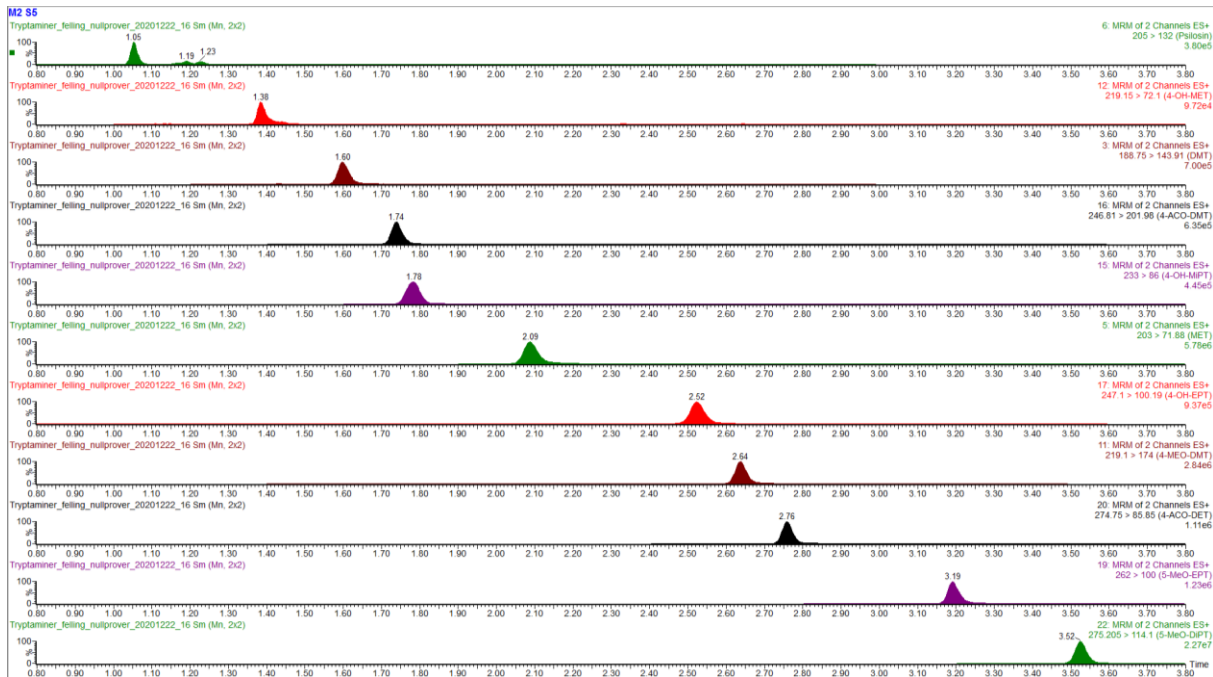
#### 4.1.5 Kromatografisk separasjon av tryptaminene

Blanding 1 og 2 (tabell 3.3) ble tilsatt i blod og deretter preparert vha. PPT (kapittel 3.5.1) før analyse med UHPLC-MS/MS ble utført. Instrumentelle betingelser vist i kapittel 3.3.1 ble benyttet. Oppnådde kromatogrammer for standardløsning (1  $\mu\text{M}$ ) av blanding 1 og 2 ble bearbeidet i MassLynx og vises i figur 4.2 og 4.3.



Figur 4.2: Kromatogram oppnådd for blanding 1 ved analyse med UHPLC-MS/MS.





Figur 4.3: Kromatogram oppnådd for blanding 2 ved analyse med UHPLC-MS/MS.

Inndelingen av blanding 1 og 2 ble utført på grunnlag av  $R_T$  oppnådd i renstoffløsning og hadde som formål å gjøre det mulig å studere koeluerende analytter uten at de påvirker hverandre. Tabell 4.4 viser de koeluerende analyttene.

Tabell 4.4: Koeluerende analytter fra blanding 1 og 2 ved analyse med UHPLC-MS/MS.

<i>Blanding 1</i>		<i>Blanding 2</i>	
$R_T$ (min)	Analytt	$R_T$ (min)	Analytt
3.60	5-MeO-DPT	3.62	5-MeO-DiPT
3.21	EPT	3.19	5-MeO-EPT
2.75	MiPT	2.76	4-AcO-DET
1.77	4-OH-DET	1.78	4-OH-MiPT

Forbindelser med samme molekylformel, men ulik konnektivitet, kalles strukturisomere. Blant de 21 tryptaminene er det fire par av strukturisomere; 4-MeO-DMT og 5-MeO-DMT, 4-OH-DET og 4-OH-MiPT, 4-OH-DMT og 5-OH-DMT, og 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT. To av disse parene er ikke tilstrekkelig kromatografisk separert. Dette gjelder 4-OH-DET og 4-OH-MiPT, og 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT (tabell 4.4). For å bekrefte hvilken av disse isomere som er til stede er det nødvendig med spesifikke masseoverganger ved MS/MS.

Fra tabell 3.6 kan man se at 4-OH-DET og 4-OH-MiPT har én felles masseovergang (233.00 > 160.00). Den andre overgangen til 4-OH-DET (232.80 > 131.75) finnes også for 4-OH-MiPT, mens den andre overgangen til 4-OH-MiPT (233.00 > 86.00) finnes ikke for 4-OH-DET og anses som spesifikk. Denne overgangen må derfor undersøkes for å kunne skille 4-OH-MiPT fra 4-OH-DET. Isomerene 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT kan ikke skilles fra hverandre med overgangene benyttet i metoden. Det er nødvendig med en annen metode for bekreftelse av 4-OH-DET, 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT.

Ved bruk av tre overganger i MS-metoden vil det vil være mulig å skille 4-OH-DET fra 4-OH-MiPT. Det blir da nødvendig å vise fraværet av overgangen (233.00 > 86.00) som er spesifikk for 4-OH-MiPT og tilstedeværelsen av to overganger for 4-OH-DET. Det vil også være mulig å skille isomere fra hverandre basert på deres ioneratio, som er forholdet mellom responsen (topphøyde eller -areal) til kvalitativ (den masseovergangen med lavest intensitet) og kvantitativ overgang (den masseovergangen med høyest intensitet).

#### 4.1.6 Vurdering av ulike opparbeidelsesmetoder

I denne oppgaven ble PPT og LLE utført (kapittel 3.5) på 21 tryptaminer i fullblod. Tryptaminene var fordelt i to blandinger (tabell 3.3) og bakgrunnen for dette er beskrevet i kapittel 3.2.1. Forsøkene ble utført med tre replikater og to ulike konsentrasjonsnivåer, 0,04 og 0,8  $\mu\text{M}$ , og beregnede utbytter vises i tabell 4.5.

Tabell 4.5: Beregnede utbytter (%) ved PPT og LLE for 21 tryptaminer med lav (0,04 µM) og høy konsentrasjon (0,8 µM), n=3.

Analytt	PPT				LLE			
	Lav		Høy		Lav		Høy	
	Utbytte (%)	RSD (%)	Utbytte (%)	RSD (%)	Utbytte (%)	RSD (%)	Utbytte (%)	RSD (%)
4-AcO-DET	68	11	74	13	-	-	6,5	12
4-AcO-DiPT	79	5,6	72	0,8	25	21	11	16
4-AcO-DMT	63	17	76	13	-	-	17	6,7
4-AcO-MET	69	6,0	70	3,8	25	13	28	10
4-MeO-DMT	73	6,8	68	11	56	51	39	25
4-OH-DET	-	-	-	-	-	-	-	-
4-OH-DMT	-	-	9,8*	51	-	-	13	61
4-OH-EPT	11	41	16	40	-	-	-	-
4-OH-MET	-	-	14	44	-	-	-	-
4-OH-MiPT	-	-	13	48	-	-	-	-
5-MeO-DiPT	78	2,8	76	11	71	18	45	35
5-MeO-DMT	86	13	65	3,8	97	3,7	72	13
5-MeO-DPT	83	2,8	70	1,8	94	3,6	53	10
5-MeO-EPT	72	27	75	8,5	77	12	56	16
5-OH-DMT	51	14	24	12	54	14	1,3	47
DMT	-	-	70	12	73	18	72	13
EPT	88	4,4	72	3,0	97	3,2	89	9,4
MET	91	5,1	76	13	61	41	70	14
MiPT	89	7,1	69	2,3	100	2,1	90	8,5
N,N-DMT-N-Oksid	80	3,3	68	3,1	40	3,9	46	16
Tryptamin	-	-	47	16	-	-	52	12

\*n=2

Respons med S/N-ratio under ti, ble ikke tatt med i beregningen av utbytte. Slik unngås forveksling av støy fra løsemiddel og MF med respons fra analytt. Man kan se at flere analytter har beregnede utbytter ved høyt konsentrasjonsnivå, men ikke ved lavt (tabell 4.5). Det ble dermed fastslått at det lave konsentrasjonsnivået var for lavt. For å sikre tilstrekkelige responser ved stabilitetsforsøkene med tryptaminer i fullblod, med lavt og høyt konsentrasjonsnivå, ble det lave konsentrasjonsnivået endret fra 0,04 til 0,1 µM.

Det ble oppnådd høyere utbytte ved lavt enn ved høyt konsentrasjonsnivå for flere av analyttene. Dette gjelder spesielt 5-OH-DMT, MeO-substituerte tryptaminer og 4-AcO-DiPT

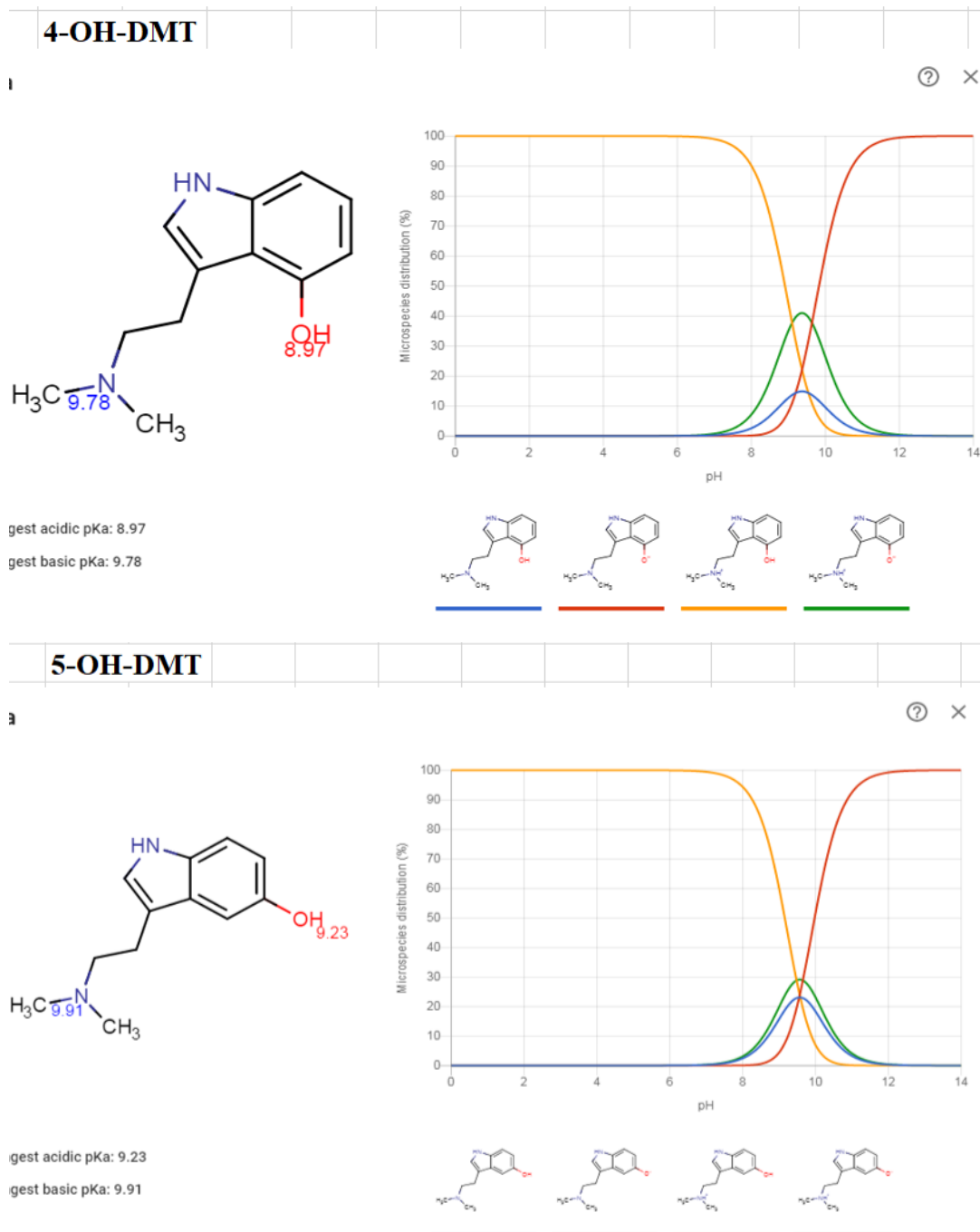
ved LLE. For sistnevnte kan det forklares med at forbindelsen gikk i metning ved det høye konsentrasjonsnivået og resultatet er dermed ikke representativt. Konsentrasjonsnivå skal ikke ha betydning på utbyttet og dette bør undersøkes nærmere hvis LLE vurderes som prøveopparbeidelsesmetode.

Det ble benyttet to ulike overganger ved lavt og høyt konsentrasjonsnivå til kvantifisering av 5-MeO-DPT ved LLE. Bakgrunnen for dette var at det ved lavt konsentrasjonsnivå kun var en overgang som ga tilstrekkelig respons, mens ved høyt konsentrasjonsnivå var denne overgangen i metning og dermed ble den andre overgangen valgt, da denne ga tilfredsstillende respons.

Ved LLE kan man se manglende eller lave utbytter for alle tryptaminene med 4-OH-substituert indolring (tabell 4.5), samt 5-OH-DMT ved høyt konsentrasjonsnivå. Grunnen til de lave/manglende utbyttede for OH-substituerte tryptaminer ved LLE kan knyttes til at forbindelsene kan forekomme i ulike former, avhengig av om forbindelsenes sure (OH) og basiske (amin) gruppe i molekylet er ladet eller ikke, noe som avhenger av pH (figur 4.4). Det er i hovedsak den uladde molekylformen som overføres til organisk fase ved LLE (kapittel 2.2.2), mens resten separeres bort sammen med vannfasen. I dette forsøket ble pH 9 benyttet og figur 4.4 viser at størst andel av uladd molekylform for 4- og 5-OH-DMT er ved denne pH-verdien. Utbyttet for OH-substituerte tryptaminer kan dermed ikke forbedres ved en annen pH og det konkluderes med at LLE ikke er en egnet opparbeidelsesmetode for disse tryptaminene. Ved PPT kommer det frem at posisjonen for substituenten har betydelig innvirkning på forbindelsens egenskaper. De 4-OH-substituerte tryptaminene fikk det høyeste utbyttet beregnet til 16 % og variasjonen var minst 40 %, mens 5-OH-DMT fikk utbytte og varians beregnet til henholdsvis 54 og 12 % ved høyt konsentrasjonsnivå (tabell 4.5). Det konkluderes med at heller ikke PPT er en egnet opparbeidelsesmetode for disse tryptaminene.

Ved LLE for tryptaminene med AcO-substituert indolring ble det oppnådd utbytter på under 28 % (tabell 4.5), og for de MeO- og usubstituert indolring ble det oppnådd varierende utbytter på henholdsvis 39 – 97 % og 40 - 100 % (tabell 4.5). Disse tryptaminene har en basisk gruppe (amin) på molekylet som kan være ladet eller ikke ladet, avhengig av pH. Ved utført LLE ble pH 9 benyttet og ved denne pH-verdien utgjør den uladde molekylformen en andel på under 25 og 50 % for henholdsvis 5-MeO-DiPT (figur 4.5) og DMT (figur 4.6). Verdiene kan variere noe for andre MeO- og usubstituerte tryptaminer. Det antas at også AcO-

substituerte tryptaminer påvirkes av pH på tilsvarende måte, grunnet lignende kjemisk struktur. For disse øker andelen av uladd molekylform med økende pH og ved tilsettelse av buffer med pH 12 vil disse kunne ekstraheres bra (figur 4.5 og 4.6).

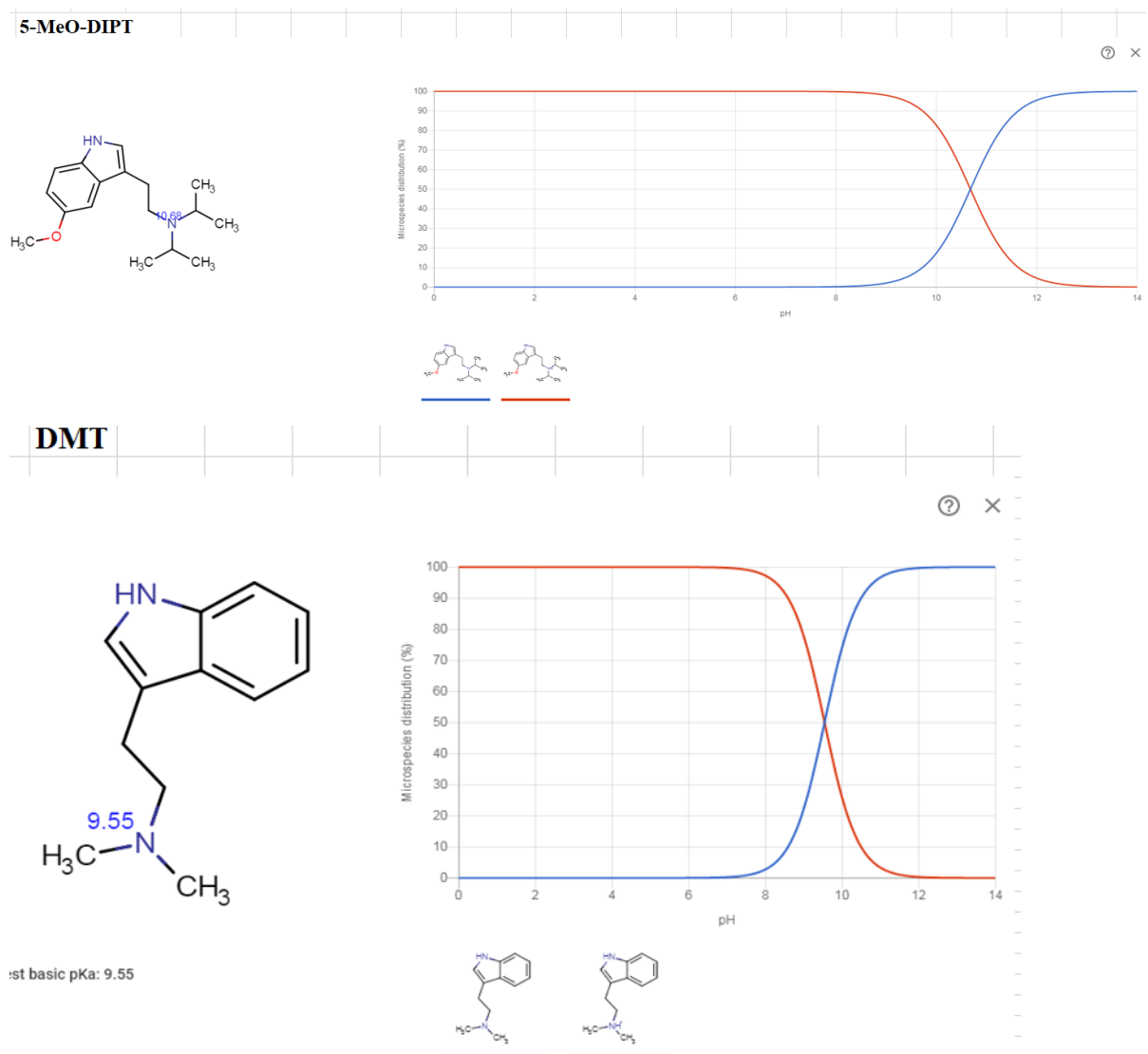


Figur 4.4: Bjerrumplot av 4-OH-DMT (øverst) og 5-OH-DMT (nederst), som viser sammenhengen mellom pH og forholdet mellom mengde syre og tilsvarende base.

Ingen av de to undersøkte opparbeidelsesmetodene var optimale for utvalget av tryptaminer og ved mer tid til oppgaven ville andre mulige prøveoppbeidelsesmetoder blitt undersøkt,

men det måtte prioriteres å oppnå resultater ved stabilitetsstudien med tryptaminer i fullblod.

Ved vurderingen av opparbeidelsesmetodene ble det tatt med i betraktningen at metoden skulle benyttes til tolkning av stabilitet. Det var dermed avgjørende med en metode med lav variasjon (RSD) i respons for å kunne skille mellom variasjonen grunnet metoden og variasjonen grunnet stabiliteten. I tillegg kreves tilstrekkelige utbytter, da variasjonen i responsen for forbindelser med lave utbytter er mer fremtredende og forbindelsene følgelig kan mistolkes som ustabile. Etter sammenligning av resultatene oppnådd for hver analytt ved PPT og LLE, ble PPT ansett som den metoden som resulterte i flest tilstrekkelige utbytter med lavest variasjon, og denne ble valgt som prøveoppbeidelsesmetode ved stabilitetsstudien med tryptaminer i fullblod.



Figur 4.6: Bjerrumplot av 5-MeO-DIPT (øverst) og DMT (nederst), som viser sammenhengen mellom pH og forholdet mellom mengde syre og tilsvarende base.

## 4.2 Stabilitetsstudie

Stabiliteten av tryptaminer ble undersøkt for renstoffløsninger av analyttene i organiske løsningsmidler og i fullblod ved flere forskjellige betingelser som kan være aktuelle i forbindelse med rutineanalyser av stoffene.

### 4.2.1 Stabilitet i renstoffløsninger

Stabiliteten av 21 tryptaminer i renstoffløsninger ble undersøkt i romtemperatur (både lyst og mørkt), kjøleskap og fryser ved analyse med UHPLC-MS/MS. Tryptaminene lagret i romtemperatur ble analysert etter null, tre og 14 dager, mens tryptaminene lagret i kjøleskap og fryser ble analysert etter null og 14 dager. Stabiliteten studeres ved å undersøke hvordan responsen forandres over tid. Tabell 4.6 viser oppnådde resultater og RSD som representerer metodens presisjon. Antall replikater forkortes med n.

Tabell 4.6: Resultater fra stabilitetsstudien av 21 tryptaminer i renstoffløsninger lagret i romtemperatur (lyst og mørkt), kjøleskap og fryser.

Analytt	Dag	n	Oppbevaringsforhold							
			Romtemperatur, lyst		Romtemperatur, mørkt		Kjøleskap		Fryser	
			Respons (%)	RSD (%)	Respons (%)	RSD (%)	Respons (%)	RSD (%)	Respons (%)	RSD (%)
4-AcO-DET	0	9	100	3,0	100	2,9	100	2,9	100	2,9
	3	3	60	11	11	18	-	-	-	-
	14	3	0,3	12	0,8	3,9	62	19	135	12
4-AcO-DiPT	0	9	100	1,1	100	1,1	100	1,1	100	1,1
	3	3	66	6,5	53	15	-	-	-	-
	14	3	47	1,0	47	9,1	124	24	144	9,7
4-AcO-DMT	0	9	100	10	100	10	100	10	100	10,0
	3	3	91	2,8	84	8,2	-	-	-	-
	14	3	45	7,0	37	3,5	77	17	124	13
4-AcO-MET	0	9	100	7,0	100	7,0	100	7,0	100	7,0
	3	3	6,4	13	7,9	14	-	-	-	-
	14	3	5,9	1,9	0,1	47	52	30	179	10
4-MeO-DMT	0	9	100	8,7	100	8,6	100	8,6	100	8,6
	3	3	166	10	129	4,0	-	-	-	-
	14	3	120	7,3	98	12	93	30	-	-
4-OH-DET	0	9	100	11	100	11	100	11	100	11
	3	3	156	30	262	15	-	-	-	-
	14	3	137	5,6	106	7,2	110	13	131	12
4-OH-DMT	0	9	100	5,4	100	5,4	100	5,4	100	5,4
	3	3	107	12	101	13	-	-	-	-
	14	3	141	9,5	110	9,8	97	14	140	12
4-OH-EPT	0	9	100	4,9	100	4,9	100	4,9	100	4,9
	3	3	129	13	122	5,3	-	-	-	-
	14	3	129	6,2	95	7,4	84	22	93	68
4-OH-MET	0	9	100	4,3	100	4,3	100	4,3	100	4,3
	3	3	104	7,2	136	13	-	-	-	-
	14	3	138	8,6	70	3,1	93	17	138	13
4-OH-MiPT	0	9	100	6,6	100	6,6	100	6,6	100	6,6
	3	3	112	9,5	97	11	-	-	-	-
	14	3	122	21	106	18	92	4,6	144	4,4
5-MeO-DiPT	0	9	100	6,0	100	6,0	100	6,0	100	6,0
	3	3	88	4,7	93	12	-	-	-	-
	14	3	106	9,4	93	8,4	103	22	118	19
5-MeO-DMT	0	9	100	4,2	100	4,2	100	4,2	100	4,2
	3	3	131	3,2	143	8,4	-	-	-	-
	14	3	127	19	110	2,3	113	35	160	43
5-MeO-DPT	0	9	100	18	100	18	100	18	100	18
	3	3	92	22	82	9,7	-	-	-	-
	14	3	131	25	72	30	95	14	119	14
5-MeO-EPT	0	9	100	8,7	100	8,7	100	8,7	100	8,7
	3	3	82	4,6	97	7,6	-	-	-	-
	14	3	103	7,6	85	4,8	83	11	102	14
5-OH-DMT	0	9	100	7,1	100	7,1	100	7,1	100	7,1
	3	3	89	4,0	138	3,8	-	-	-	-
	14	3	115	6,4	93	3,0	107	23	115	16
DMT	0	9	100	13	100	13	100	13	100	13
	3	3	178	11	147	7,6	-	-	-	-
	14	3	110	16	93	11	77	14	131	33
EPT	0	9	100	3,2	100	3,2	100	3,2	100	3,2
	3	3	99	4,2	95	7,6	-	-	-	-
	14	3	141	14	106	13	136	54	129	8,5
MET	0	9	100	13	100	13	100	13	100	13
	3	3	132	7,4	132	48	-	-	-	-
	14	3	112	12	84	11	89	15	111	4,9
MiPT	0	9	100	3,9	100	3,9	100	3,9	100	3,9
	3	3	92	12	102	13	-	-	-	-
	14	3	126	7,4	98	2,8	112	7,1	132	11
N,N-DMT-N-Oksid	0	9	100	6,2	100	6,2	100	6,2	100	6,2
	3	3	106	8,2	115	7,1	-	-	-	-
	14	3	135	4,0	111	6,0	98	55	136	5,7
Tryptamin	0	9	100	8,2	100	8,2	100	8,2	100	8,2
	3	3	124	11	129	22	-	-	-	-
	14	3	38	20	26	13	33	34	40	51



Tryptaminene ble regnet som stabile hvis responsens forandring holdt seg innenfor +/- 20 %. Disse ble markert med grønt i tabell 4.6, mens respons som har falt mer enn 20 % ble markert med rødt. Resultater med RSD over 25 % ses bort i fra (markert med grått i tabell 4.6), da variasjonen ikke nødvendigvis kan knyttes til stabilitet, men den kan skyldes instrumentell variasjon.

Det var god holdbarhet for mange av analyttene ved lagring i kjøleskap og det var trolig også dette i fryser, til tross for høye resultater som kan skyldes dårlig tempererte løsninger som gir et for høyt volum. For romtemperatur ved dag 3 ble uventet høye resultater oppnådd og tolkning ut ifra disse gjøres med forsiktighet. Dette forsøket ville vært gjentatt hvis det var tilstrekkelig tid til det.

Ved lagring i fryser var 4-AcO-DET, 4-AcO-DiPT, 4-AcO-DMT, 4-AcO-MET, 4-MeO-DMT, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-MET, 4-OH-MiPT, 5-MeO-DiPT, 5-MeO-DPT, 5-OH-DMT, 5-MeO-EPT, EPT, MET, MiPT og N,N-DMT-N-Oksid stabile i 14 dager (Tabell 4.6).

Ved lagring i kjøleskap var 4-AcO-DiPT, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-EPT, 4-OH-MET, 4-OH-MiPT, 5-MeO-DiPT, 5-MeO-DPT, 5-MeO-DMT, 5-OH-DMT, MET og MiPT stabile i 14 dager (Tabell 4.6), mens 4-AcO-DET, 4-AcO-DMT og DMT ikke var stabile. Dette stemmer overens med studien av Meyer et al. som viser at 4-AcO-DiPT, 4-OH-MET, 4-OH-MiPT, 5-MeO-DPT, MiPT er stabile i metanolløsninger i minst fire uker ved lagring i 8 °C, og at DMT ikke tilfredsstilte disse kravene. At DMT er mindre stabil, stemmer overens med funnet i dette forsøket.

Ved lagring lyst i romtemperatur var 4-MeO-DMT, 4-OH-DET, 4-OH-DMT, 4-OH-EPT, 4-OH-MET, 4-OH-MiPT, 5-MeO-DiPT, 5-MeO-DPT, 5-MeO-DMT, 5-OH-DMT, 5-MeO-EPT, DMT, EPT, MET, MiPT og N,N-DMT-N-Oksid stabile i 14 dager, 4-AcO-DMT og tryptamin var stabile i tre dager, mens 4-AcO-DET, 4-AcO-DiPT og 4-AcO-MET var ustabile ved lagring lyst i romtemperatur i tre dager. Ved lagring mørkt i romtemperatur ble det oppnådd tilsvarende resultater som ved lagring lyst, bortsett fra at 4-OH-MET var stabil i tre dager i forhold til 14 som gjaldt ved lagring lyst. Dette gjaldt også for 5-MeO-DPT som var stabil i tre dager ved lagring mørkt i romtemperatur, mens resultatet ved 14 dager ikke kan

tolkes grunnet for høy variasjon. Dette er ikke typiske funn, da eksponering for lys bidrar til at nedbrytningen av forbindelsen fremskyndes.

Grunnet høy variasjon kunne ikke stabilitet ved lagring i fryser kartlegges for 4-OH-EPT, 5-MeO-DMT, DMT eller tryptamin, eller ved lagring i kjøleskap for 4-AcO-MET, 4-MeO-DMT, 5-MeO-DMT, EPT, N,N-DMT-N-Oksid eller tryptamin.

Stabilitetsprøvene lagret i fryser har stått uforstyrret i 14 dager, frem til analysedagen hvor de ble tint og romtemperert. Forbindelsene som var stabile ved lagring i fryser har dermed tålt en syklus med tining og romtemperering. Stabilitetsprøvene lagret i kjøleskap har vært hentet ut og blitt plassert tilbake igjen i kjøleskap ved dag 3 og 14. Instrumentproblemer førte til at det ikke ble oppnådd resultater ved dag 3. Forbindelsene som var stabile ved lagring i kjøleskap har dermed tålt to sykluser med kjøling og romtemperering. Når stabilitetsprøvene hentes frem fra lagring for deretter å plasseres tilbake igjen, fremskyndes nedbrytningsprosessen av forbindelsen. Forbindelser som var ustabile ved lagring i kjøleskap, kan ha bedre stabilitet når de ikke utsettes for gjentatte lagringsskifter. Dette kan unngås ved at forsøket gjennomføres med lagring av analytt i egne glassvialer for hver analysedag og hver lagringsbetingelse. Glassene i romtemperatur ble analysert ved dag 0, før de ble lagret og analysert igjen dag 3, men grunnet instrumentproblemer ble det ikke oppnådd resultater. Glassene ble lagret videre og analysert ved dag 14, mens nye prøver ble lagd for analyse ved dag 0 og 3. Dette ble utført for å spare tid, men er ikke ideelt da det kan føre til en viss variasjon mellom resultatene oppnådd for de ulike glassene.

## 4.2.2 Stabilitet i blod

### **Linearitet**

Lineariteten tilhørende standardkurvene viser hvilken respons som er forventet fra en gitt konsentrasjon og brukes for å beregne konsentrasjonen av tryptaminene i stabilitetsløsningene. Hver analysedag ble det lagd nye standardløsninger i blod som ble preparert og analysert på samme måte som stabilitetsløsningene. Verdien for  $r^2$ , som beskriver standardkurvens linearitet, er vist i tabell 4.7.

Tabell 4.7: Linearitet for standardkurvene (0,05 – 1,0  $\mu$ M) til et utvalg tryptaminer, n=4.

Analytt	Linearitet, $r^2$	
	Minst	Maks
4-AcO-DET	0,9676	0,9829
4-AcO-DIPT	0,9691	0,9913
4-AcO-MET	0,9072	0,9775
4-MeO-DMT	0,9799	0,9974
5-MeO-DIPT	0,9603	0,9977
5-MeO-DMT	0,9814	0,9992
5-MeO-DPT	0,9672	0,9995
5-MeO-EPT	0,9530	0,9957
DMT	0,9355	0,9963
EPT	0,9751	0,9987
MET	0,9813	0,9990
MiPT	0,9646	0,9964
N,N-DMT-N-Oksid	0,9706	0,9995

Flere tryptaminer kunne ikke tolkes ved stabilitetsstudien med tryptaminer i fullblod, da prøveopparbeidelsesmetoden ikke var egnet for disse og null eller svært lavt utbytte ble oppnådd. Blant tryptaminene som ikke kunne inkluderes i stabilitetsstudien var alle de OH-substituerte tryptaminene. Tryptaminene i tabell 4.7 tilfredstilte nødvendige krav og kunne studeres videre.

Ved prøveopparbeidelsen utført i sammenheng med stabilitetsforsøket med tryptaminer i fullblod ble IS tilsatt på feil tidspunkt. Dette førte til dårlig linearitet ved benyttelse av intern standardkurve. Bedre linearitet ble oppnådd ved benyttelse av ekstern standardkurve. Denne ble dermed benyttet.

En god linearitet for standardkurven er avgjørende for godt samsvar mellom respons og tilhørende konsentrasjon. Dårlig linearitet kan resultere i beregning av for lave/høye konsentrasjoner for stabilitetsprøvene. Hvis standardkurven er av varierende linearitet vil dette bidra med konsentrasjonsforandring fra analysedag til analysedag. Standardkurven kan da være skyld i konsentrasjonsforandringen og ikke stabiliteten i seg selv.

Standardløsninger ble oppbevart i kjøleskap. Forbindelser som var ustabile i renstoffløsning kan ha opplevd en nedgang i konsentrasjon, som kan ha ført til at stabilitetsprøvene har fått beregnet for høye konsentrasjoner. Stabilitetsprøver oppbevart i fryser kunne fått konsentrasjoner som oversteg standardkurven. Hvis standardløsninger av ulik konsentrasjon opplever ulik grad av nedbrytning, kan dette føre til dårligere linearitet. To tryptaminer (4-OH-EPT og 4-OH-MiPT) kunne ikke inkluderes i stabilitetsstudien i fullblod grunnet dårlig linearitet. Dette kan også forklares av dårlig/variabelt utbytte.

### Mellom-serie-variasjon

Metodens nøyaktighet (BIAS) og presisjon (RSD) ble studert ved hjelp av kontrolløsninger. Hver analysedag ble nye kontrolløsninger lagd i blod, og de ble preparert og analysert på samme måte som stabilitetsløsningene. Resultatene vises i tabell 4.8.

Tabell 4.8: Metodens nøyaktighet (BIAS) og presisjon (RSD) ved analyse av kontroller med konsentrasjon på 0,1  $\mu\text{M}$  og 0,8  $\mu\text{M}$ ,  $n=8$ .

Kontroller	0,1 $\mu\text{M}$		0,8 $\mu\text{M}$	
	BIAS (%)	RSD (%)	BIAS (%)	RSD (%)
Analytt				
4-AcO-DET	-	-	15	13
4-AcO-DiPT	5,2	14	6,6	9,6
4-AcO-MET	-	-	-17	13
4-MeO-DMT	10	8,7	0,7	11
5-MeO-EPT	7,6	6,7	7,2	13
5-MeO-DiPT	10	5,4	8,6	12
5-MeO-DMT	6,0	13	1,1	10
5-MeO-DPT	-5,8	15	2,0	8,6
DMT	-	-	13	15
EPT	9,9	14	9,5	7,4
MET	7,2	5,4	3,7	10
MiPT	4,5	14	-0,1	10
N,N-DMT-N-Oksid	19	16	9,9	8,5

Tryptaminene i tabell 4.8 (og tabell 4.7) er de som tilfredsstillt kravene til utbytte, linearitet for standardkurven og har kontroller med akseptabel RSD og BIAS. Grensen for akseptabel

RSD og BIAS ble satt til +/- 20 % ("Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology," 2013). Man kan se manglende resultater for kontrollene til 4-AcO-DET, 4-AcO-MET og DMT ved lavt konsentrasjonsnivå (tabell 4.8), dette skyldes for lav S/N-ratio. Disse studeres videre kun ved høyt konsentrasjonsnivå.

### **Stabilitet**

Stabilitet ble kartlagt ved undersøkelse av hvordan konsentrasjonen av analytt i fullblod forandret seg over tid. Det ble benyttet to konsentrasjonsnivåer, 0,1 og 0,8  $\mu\text{M}$ , og resultatet vises i henholdsvis tabell 4.9 og 4.10. I tabellene representerer RSD (relativt standardavvik) metodens presisjon. Antall replikater (n) er tre hvis ikke annet er oppgitt.

Tabell 4.9: Beregnede konsentrasjoner av tryptaminer (0,1 µM) i blod, oppbevart i romtemperatur, kjøleskap og fryser.

Analytt (0,1µM)	Dag	Lagringsforhold								
		Romtemperatur			Kjøleskap			Fryser		
		n	Kons. (%)	RSD (%)	n	Kons. (%)	RSD (%)	n	Kons. (%)	RSD (%)
4-AcO-DiPT	0	2	100	11	2	100	11	2	100	11
	1		51	0,8	2	81	6,3	2	97	11
	7		-	-	2	61	11	2	83	13
	14		-	-	2	30	6,8	2	48	13
4-MeO-DMT	0		100	26		100	26		100	26
	1		87	14		84	16		95	21
	7		97	6,8		103	2,8		105	11
	14		89	2,7		101	3,9		96	5,9
5-MeO-DiPT	0		100	24		100	24		100	24
	1		77	19		78	30		87	24
	7		81	4,9		88	7,8		90	5,1
	14		94	0,9		96	4,0		94	8,5
5-MeO-DMT	0		100	15		100	15		100	15
	1		117	4,3		104	4,5		117	3,3
	7		100	6,5		101	6,4		101	1,1
	14		98	10		100	6,4		100	9,3
5-MeO-DPT	0		100	23		100	23		100	23
	1		134	4,3		122	9,5		131	4,4
	7		125	5,1		121	5,3		120	4,1
	14		121	8,9		119	9,1		117	12
5-MeO-EPT	0	2	100	4,3	2	100	4,3	2	100	4,3
	1		63	24		63	30		71	25
	7		74	4,9		80	7,8		82	5,1
	14		79	5,2		85	0,8		81	12
EPT	0		100	20		100	20		100	20
	1		134	4,3		120	8,3		133	3,1
	7		119	6,0		117	3,8		115	7,9
	14		119	11		114	11		111	13
MET	0		100	16		100	16		100	16
	1		66	19		70	23		79	21
	7		90	3,3		92	0,6		94	6,7
	14		87	2,2		93	3,1		84	15
MiPT	0		100	17		100	17		100	17
	1		124	5,6		117	9,4		127	5,1
	7		116	4,9		115	8,3		115	3,1
	14		109	5,8		108	12		103	9,9
N,N-DMT-N-Oksid	0		100	19		100	19		100	19
	1		131	3,6		125	8,7		136	0,9
	7		112	12		118	5,7		118	1,1
	14		97	17		111	7,3		111	10

Tabell 4.10: Beregnede konsentrasjoner av tryptaminer (0,8 µM) i blod, oppbevart i romtemperatur, kjøleskap og fryser.

Analytt (0,8µM)	Dag	Lagringsforhold								
		Romtemperatur			Kjøleskap			Fryser		
		n	Kons. (%)	RSD (%)	n	Kons. (%)	RSD (%)	n	Kons. (%)	RSD (%)
4-AcO-DET	0	2	100	27	2	100	27	2	100	27
	1		-	-	2	23	6,2	2	33	12
	7		-	-		-	-	2	20	4,7
	14		-	-		-	-	2	15	11
4-AcO-DiPT	0	2	100	4,5	2	100	4,5	2	100	4,5
	1	2	44	18	2	96	12	2	79	16
	7		-	-	2	77	13	2	89	12
	14		-	-	2	60	15	2	83	8,1
4-AcO-MET	0	2	100	4,7	2	100	4,7	2	100	4,7
	1		-	-	2	57	20	2	52	0,9
	7		-	-	2	23	22	2	50	17
	14		-	-	2	12	17	2	36	19
4-MeO-DMT	0		100	26		100	26		100	26
	1		92	19		100	6,2		105	9,5
	7		98	2,2		100	5,0		97	5,3
	14		90	6,6		99	0,8		86	13
5-MeO-EPT	0		100	29		100	29		100	29
	1		89	20		99	8,9		107	6,0
	7		97	3,5		100	6,0		96	3,2
	14		89	4,2		95	3,8		87	9,1
5-MeO-DiPT	0		100	32		100	32		100	32
	1		88	22		97	6,8		101	8,7
	7		94	3,5		98	6,0		94	3,2
	14		92	4,7		96	3,3		88	6,6
5-MeO-DMT	0	2	100	2,0	2	100	2,0	2	100	2,0
	1		103	7,2		103	9,8		99	21
	7		93	5,1		98	2,0		94	3,7
	14		95	11		97	4,3		94	5,3
5-MeO-DPT	0	2	100	1,9	2	100	1,9	2	100	1,9
	1		104	10		104	12		97	20
	7		101	2,9		108	2,4		101	3,1
	14		104	8,8		104	1,8		100	3,3
DMT	0		100	26		100	26		100	26
	1		79	18		89	1,8		100	14
	7		87	12		100	10		97	2,5
	14		73	9,6		91	1,7		88	9,3
EPT	0	2	100	0,1	2	100	0,1	2	100	0,1
	1		104	8,8		104	13		96	19
	7		97	4,6		98	5,5		98	3,8
	14		100	9,4		101	2,8		97	4,2
MET	0		100	29		100	29		100	29
	1		83	20		90	4,7		97	8,9
	7		100	1,2		101	1,1		97	4,8
	14		90	3,0		97	1,6		89	7,0
MiPT	0	2	100	3,0	2	100	3,0	2	100	3,0
	1		102	9,0		104	12		97	19
	7		97	4,9		102	3,4		97	3,1
	14		97	7,4		98	1,3		94	2,8
N,N-DMT-N-Oksid	0	2	100	2	2	100	2	2	100	2
	1		104	8,8		106	11		102	21
	7		89	9,1		105	2,2		100	0,5
	14		83	15		98	1,3		96	3,7

Analysene utført av blanding 1 (tabell 3.3) ved høyt konsentrasjonsnivå på dag null viste avvikende resultater for alle forbindelsene i den ene stabilitetsprøven. Denne ble dermed sett bort i fra og er ikke med i tabell 4.10. Resultatene med to replikater ble tolket med høyere grad av forsiktighet.

Alle tryptaminene, med unntak av de AcO-substituerte, var stabile i 14 dager ved alle lagringsforholdene både ved lavt og høyt konsentrasjonsnivå (tabell 4.9 og 4.10). Dette stemmer overens med funnene i studien til Martin et al. som viste at 4-OH-DMT og 5-OH-DMT ga akseptable resultater for frys-tin-stabilitet og langtidsstabilitet i serum i seks uker ved -20°C (Martin et al., 2013). Ved høyt konsentrasjonsnivå (tabell 4.10) var 4-AcO-DiPT stabil i 14 dager ved lagring i fryser, mens ved lavt konsentrasjonsnivå var den stabil i syv dager (tabell 4.9). Ved både lavt og høyt konsentrasjonsnivå var 4-AcO-DiPT stabil i en dag ved lagring i kjøleskap og den var ikke stabil ved lagring i romtemperatur. 4-AcO-DET og 4-AcO-MET ble kun studert ved høyt konsentrasjonsnivå (tabell 4.10) og var svært ustabile ved lagring i fryser og kjøleskap. Kapittel Manglende resultat ved romtemperatur kan mest sannsynlig knyttes til forbindelsenes ustabilitet.

Resultatet oppnådd for 4-AcO-DET ved dag 0 har en variasjon som akkurat overstiger verdien for hva som er akseptabelt, men den betydelige reduksjonen i konsentrasjon som ble sett etter lagring i en dag i kjøleskap og ved dag en, syv og 14 i fryser, tyder allikevel på at forbindelsen var ustabil. Resultatet oppnådd for DMT (tabell 4.10) har en variasjon som akkurat overstiger akseptabel verdi. DMT reduseres med 27 % i løpet av 14 dager ved lagring i romtemperatur. Forbindelsen regnes som stabil, da det trolig er den høye variasjonen ved dag null som fører til at konsentrasjonsforandringen faller utenfor det som ble regnet som akseptabelt. Resultatet ved lav konsentrasjon for 5-MeO-EPT (tabell 4.9) viser en reduksjon på 21 % i løpet av 14 dager ved lagring i romtemperatur. Denne regnes som stabil selv om konsentrasjonsforandringen akkurat falt utenfor akseptabel forandring.

Funnene gjort i dette forsøket viser at tiden mellom prøvetaking og rettstoksikologisk analyse ikke er kritisk for dette utvalget av tryptaminer, med unntak av de AcO-substituerte tryptaminene som bør analyseres uten mer ventetid enn nødvendig. Praksisen ved Avdelingen for rettstoksikologisk analytikk ved OUS ble lagt om ved mistanke om 4-OH-DMT, slik at analytten analyseres uten mer ventetid enn absolutt nødvendig, noe som har resultatet i flere positive funn. Det bør vurderes om denne praksisen også skal inkludere AcO-substituerte



tryptaminer.

På analysedagen ble stabilitetsprøvene tatt frem fra lagringsforholdene, før de ble temperert og en gitt mengde ble pipettert ut. Prøveopparbeidelsen ble utført på denne mengden. Stabilitetsprøvene ble deretter plassert tilbake til lagringsforholdet til neste analysedag. Forbindelsene som var stabile ved lagring i 14 dager i fryser har dermed tålt tre frys-tin-sykluser og forbindelsene som var stabile ved lagring i kjøleskap i 14 dager har tålt tre sykluser av kjøling og romtemperering. Dette lagringsskifte kan ha ført til hurtigere nedbrytning av ustabile forbindelser og ideelt sett burde forsøket blitt utført med ett prøvesett per lagringsbetingelse og dag.

Flere forbindelser viste en økning i beregnet konsentrasjon (%). Ved stor variasjon for resultatene oppnådd ved dag null, kan virkelig og gjennomsnittlig konsentrasjon avvike. Konsentrasjonen kan følgelig oversige 100 % neste analysedag. Eventuell fordampning av organisk løsemiddel grunnet utette plastrør/-korker kan føre til oppkonsentrering. Konsentrasjonen til stabilitetsprøvene beregnes ut ifra standardkurver. Hvis standardløsningene har gjennomgått en nedbrytning grunnet ustabilitet i kjøleskap kan dette føre til at beregnet konsentrasjon blir for høy. Hvis prøvene ikke tempereres tilstrekkelig før utpipettering, fører dette til at et for stort volum pipetteres ut og konsentrasjonen blir for høy.

### 4.3 Videre arbeid

Siden ingen av prøveopparbeidelsesmetodene benyttet i denne oppgaven var tilfredsstillende for hele utvalget av tryptaminer bør andre prøveopparbeidelsesmetoder forsøkes, f.eks. immobilisert LLE, fosfolipidfjerningskolonner og SPE. Separasjonen burde vært forsøkt forbedret eller deteksjonen ved hjelp av spesifikke overganger.

Stabilitetsforsøkene burde gjentas med egne prøvesett for hver betingelse og hver dag, for at påvirkning fra frys/tin og frem og tilbake i kjøleskap skal unngås. Ved ny utførelse av stabilitetsforsøk med tryptaminer i fullblod bør IS tilsettes så tidlig som mulig i prøveopparbeidelsesmetoden og alle kontroll- og standardløsninger bør oppbevares i fryser. Langtidsstabilitet, stabilitet i ekstrakt og frys/tin-stabilitet burde undersøkes for utvalget av tryptaminer. Det ville vært interessant å studere om de AcO-substituerte tryptaminene får

forbedret stabilitet med DMSO som løsemiddel og askorbinsyre som konserveringsmiddel, som Meyer et al. beskriver.

## 5. Konklusjon

Separasjon av 21 tryptaminer ble forsøkt med UHPLC-MS/MS med en 7,5 min. lang gradient. Gradienten førte til separasjon av 13 tryptaminer, mens 5-MeO-DPT og 5-MeO-DiPT, EPT og 5-MeO-EPT, MiPT og 4-AcO-DET, og 4-OH-DET og 4-OH-MiPT ikke ble kromatografisk separert. Metoden kunne ikke benyttes for bekreftelse av 4-OH-DET, 5-MeO-DiPT og 5-MeO-DPT. To prøve-opparbeidelsesmetoder, PPT og LLE, ble evaluert for de 21 tryptaminene. Ingen av metodene var egnet for de OH-substituerte tryptaminene.

Ved stabilitetsstudien av 21 tryptaminer i renstoffløsning var 17 tryptaminer stabile fryser ved lagring i 14 dager, 12 var stabile i kjøleskap ved lagring i 14 dager, 16 var stabile i romtemperatur (lyst) i 14 dager, mens 2 var stabile i tre dager, og ved lagring mørkt i romtemperatur var 14 tryptaminer stabile i 14 dager, mens 4 var stabile i tre dager. De minst stabile tryptaminene i renstoffløsning var 4-AcO-DET, 4-AcO-DMT og DMT som var ustabile ved lagring i kjøleskap i 14 dager og 4-AcO-DET, 4-AcO-DiPT og 4-AcO-MET som var ustabile ved lagring i romtemperatur (lyst og mørkt) i tre dager. Grunnet høy variasjon kunne ikke stabilitet ved lagring i fryser kartlegges for 4-OH-EPT, 5-MeO-DMT, DMT eller tryptamin, eller ved lagring i kjøleskap for 4-AcO-MET, 4-MeO-DMT, 5-MeO-DMT, EPT, N,N-DMT-N-Oksid eller tryptamin.

Ved stabilitetsstudien av 13 tryptaminer i fullblod lagret i romtemperatur, kjøleskap og fryser var alle tryptaminene, med unntak av de AcO-substituerte, stabile i 14 dager ved lavt og høyt konsentrasjonsnivå. 4-AcO-DiPT var stabil i fryser i to uker ved høyt konsentrasjonsnivå og en uke ved lavt konsentrasjonsnivå, mens den var stabil en dag i kjøleskap og ustabil i romtemperatur. 4-AcO-DET og 4-AcO-MET (høyt konsentrasjonsnivå) var ustabile ved lagring i fryser og kjøleskap.

Stabilitetsfunnene for 21 tryptaminer i renstoffløsninger viste at ved tilfeller hvor bruksløsningene blir stående i romtemperatur vil de for dette utvalget av tryptaminer allikevel kunne brukes senere, med unntak av de AcO-substituerte tryptaminene. Stabilitetsfunnene for 13 tryptaminer i fullblod viste at tiden mellom prøvetaking og rettstoksikologisk analyse ikke er kritisk for dette utvalget av tryptaminer, med unntak av de AcO-substituerte tryptaminene som bør analyseres uten mer ventetid enn nødvendig.

## 6. Litteraturliste

- Adamowicz, P., & Tokarczyk, B. (2016). Simple and rapid screening procedure for 143 new psychoactive substances by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 8(7), 652-667. <https://doi.org/10.1002/dta.1815>
- Ambach, L., Hernández Redondo, A., König, S., & Weinmann, W. (2014). Rapid and simple LC-MS/MS screening of 64 novel psychoactive substances using dried blood spots. *Drug Testing and Analysis*, 6(4), 367-375. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/dta.1505>
- Araújo, A. M., Carvalho, F., Bastos, M. d. L., Guedes de Pinho, P., & Carvalho, M. (2015). The hallucinogenic world of tryptamines: an updated review. *Archives of Toxicology*, 89(8), 1151-1173. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1513-x>
- Berg, T., & Strand, D. H. (2011). <sup>13</sup>C labelled internal standards--a solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *Journal of chromatography. A*, 1218(52), 9366-9374. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.081>
- Bergh, M. S.-S. (2020). *Fentanyl Analogs: Development of Bioanalytical Methods for Forensic Case Work and Studies of Metabolism and Pharmacodynamic Effects*. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo.
- Brandt, S. D., Freeman, S., McGagh, P., Abdul-Halim, N., & Alder, J. F. (2004). An analytical perspective on favoured synthetic routes to the psychoactive tryptamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36(4), 675-691. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.08.022>
- Cameron, L. P., & Olson, D. E. (2018). Dark Classics in Chemical Neuroscience: N,N-Dimethyltryptamine (DMT). *ACS Chemical Neuroscience*, 9(10), 2344-2357. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00101>
- Cole, B. R. (2019). *Electrospray and MALDI Mass Spectrometry* (2 ed.). Wiley.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3 ed.). John Wiley & Son. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>
- EMCDDA. (2019). *EMCDDA operating guidelines for the European Union Early Warning System on new psychoactive substances*. Publications Office of the European Union. Hentet 29. januar 2021 fra [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12213/EWS%20guidelines\\_final.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/12213/EWS%20guidelines_final.pdf)
- EMCDDA. (2020). New psychoactive substances: global markets, global threats and the COVID-19 pandemic. An update from the EU Early Warning System (December 2020). *Publications Office of the European Union, Luxembourg*. Hentet 10.mars fra [https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13464/20205648\\_TD0320796ENN\\_PDF\\_rev.pdf](https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13464/20205648_TD0320796ENN_PDF_rev.pdf)
- Fagiola, M., Hahn, T., & Avella, J. (2018). Screening of Novel Psychoactive Substances in Postmortem Matrices by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS-MS). *Journal of Analytical Toxicology*, 42(8), 562-569. <https://doi.org/10.1093/jat/bky050>
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 246(4926), 64-71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>

- Flaminia, P., Silvia, G., Roberta, P., Francesco Paolo, B., & Simona, P. (2019). New Psychoactive Substances: A Matter of Time. *Current Neuropharmacology*, 17(9), 818-822. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1570159X1709190729101751>
- Forening, N. B. (2021). *Neslefamilien*. Hentet 29. mars fra <https://botaniskforening.no/neslefamilien>
- Forskrift om narkotika (narkotikaforskriften), (2013). Hentet 4. januar 2021 fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumentarkiv/stoltenberg-ii/hod/Nyheter-og-pressemeldinger/nyheter/2013/ny-narkotikaforskrift/id714650/>
- Garrison, K. A., Zeffiro, T. A., Scheinost, D., Constable, R. T., & Brewer, J. A. (2015). Meditation leads to reduced default mode network activity beyond an active task. *Cognitive, affective & behavioral neuroscience*, 15(3), 712-720. <https://doi.org/10.3758/s13415-015-0358-3>
- Gjerde, H., Øiestad, E. L., & Christophersen, A. S. (2011). Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse. *Norsk Epidemiologi*, 21(1), 5-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.5324/nje.v21i1.1420>
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D., & Gennaro, M. C. (2010). Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 3929-3937. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.060>
- Gumustas, M., Zalewski, P., Ozkan, S. A., & Uslu, B. (2019). The History of the Core-Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography. *Chromatographia*, 82(1), 17-48. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3670-6>
- Haag, A. M. (2016). Mass Analyzers and Mass Spectrometers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 919, 157-169. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-41448-5_7)
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., & Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(3), 313-316. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.08.020>
- He, Y., & Concheiro-Guisan, M. (2019). Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. *Biomed Chromatogr*, 33(1), e4444. <https://doi.org/10.1002/bmc.4444>
- Ho, C. S., Lam, C. W. K., Chan, M. H. M., Cheung, R. C. K., Law, L. K., Lit, L. C. W., Ng, K. F., Suen, M. W. M., & Tai, H. L. (2003). Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *The Clinical biochemist. Reviews*, 24(1), 3-12. Hentet 29. januar 2021 fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1853331/>
- Hoffmann, E. d., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry - Principles and Applications* (3 ed.). John Wiley and Sons.
- Kebarle, P., & Peschke, M. (2000). On the mechanisms by which the charged droplets produced by electrospray lead to gas phase ions. *Analytica Chimica Acta*, 406(1), 11-35. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00598-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00598-X)
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., & Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J Am Soc Mass Spectrom*, 11(11), 942-950. [https://doi.org/10.1016/s1044-0305\(00\)00163-x](https://doi.org/10.1016/s1044-0305(00)00163-x)
- Levine, B. (2003). *Principles of Forensic Toxicology* (2 ed.) American Association for Clinical Chemistry.
- Martin, R., Schürenkamp, J., Gasse, A., Pfeiffer, H., & Köhler, H. (2013). Determination of psilocin, bufotenine, LSD and its metabolites in serum, plasma and urine by SPE-LC-MS/MS. *International Journal of Legal Medicine*, 127(3), 593-601. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0796-1>

- Maurer, H. H. (2006). Hyphenated mass spectrometric techniques—indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control [<https://doi.org/10.1002/jms.1112>]. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(11), 1399-1413. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jms.1112>
- Mbughuni, M. M., Jannetto, P. J., & Langman, L. J. (2016). Mass Spectrometry Applications for Toxicology. *EJIFCC*, 27(4), 272-287. Hentet 31.januar fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5282913/>
- McKenna, D., & Riba, J. (2018). New World Tryptamine Hallucinogens and the Neuroscience of Ayahuasca. In A. L. Halberstadt, F. X. Vollenweider, & D. E. Nichols (Eds.), *Behavioral Neurobiology of Psychedelic Drugs* (pp. 283-311). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2016\\_472](https://doi.org/10.1007/7854_2016_472)
- Meyer, M. R., Caspar, A., Brandt, S. D., & Maurer, H. H. (2014). A qualitative/quantitative approach for the detection of 37 tryptamine-derived designer drugs, 5  $\beta$ -carbolines, ibogaine, and yohimbine in human urine and plasma using standard urine screening and multi-analyte approaches. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(1), 225-237. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7425-9>
- Miller, J. M. (2009). *Chromatography - Concepts and Contrasts* (2 ed.). John Wiley and Sons.
- Montesano, C., Vannutelli, G., Piccirilli, V., Sergi, M., Compagnone, D., & Curini, R. (2017). Application of a rapid  $\mu$ -SPE clean-up for multiclass quantitative analysis of sixteen new psychoactive substances in whole blood by LC-MS/MS. *Talanta*, 167, 260-267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.019>
- Nature, F. (2021). *Psilocybe semilanceata*. Hentet 10. mars 2021 fra <https://www.first-nature.com/fungi/psilocybe-semilanceata.php>
- Negrusz, A. C., Gail. (2013). *Clarke's Analytical Forensic Toxicology* (2 ed.). Pharmaceutical Press.
- Nichols, D. E. (2004). Hallucinogens. *Pharmacology & Therapeutics*, 101(2), 131-181. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.11.002>
- Nutt, D. (2019). Psychedelic drugs-a new era in psychiatry? . *Dialogues in clinical neuroscience*, 21(2), 139-147. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2019.21.2/dnutt>
- Olaisen, B. (2020). *Rettsmedisin*. Hentet 29. januar 2021 fra <https://sml.snl.no/rettsmedisin>
- Oslo-universitetssykehus. (2016). *Rettsstoksikologiske analyser*. Hentet 8. februar 2021 fra <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rettsmedisinske-fag/rettstoksikologiske-analyser>
- Phenomenex. (2021). *Phase Information*. Hentet 28. januar 2021 fra <https://www.phenomenex.com/Kinetex/Selectivities>
- Polson, C., Sarkar, P., Inledon, B., Raguvaran, V., & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 785(2), 263-275. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5)
- Remane, D., Wissenbach, D. K., & Peters, F. T. (2016). Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry*, 49(13), 1051-1071. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.010>
- Schulz, M., Iwersen-Bergmann, S., Andresen, H., & Schmoldt, A. (2012). Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Crit Care*, 16(4), R136. <https://doi.org/10.1186/cc11441>
- Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. (2013). *Journal of Analytical Toxicology*, 37(7), 452-474. <https://doi.org/10.1093/jat/bkt054>

- Shen, H.-W., Jiang, X.-L., & Yu, A.-M. (2009). Development of a LC-MS/MS method to analyze 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine and bufotenine, and application to pharmacokinetic study. *Bioanalysis*, 1(1), 87-95. <https://doi.org/10.4155/bio.09.7>
- Simão, A. Y., Antunes, M., Marques, H., Rosado, T., Soares, S., Gonçalves, J., Barroso, M., Andraus, M., & Gallardo, E. (2020). Recent bionalytical methods for the determination of new psychoactive substances in biological specimens. <https://doi.org/10.4155/bio-2020-0148>
- Skei, J. K. (2021). *Nordpadde*. Hentet 10. mars 2021 fra <https://snl.no/nordpadde>
- Sklerov, J., Levine, B., Moore, K. A., King, T., & Fowler, D. (2005). A Fatal Intoxication Following the Ingestion of 5-Methoxy-N,N-Dimethyltryptamine in an Ayahuasca Preparation. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(8), 838-841. <https://doi.org/10.1093/jat/29.8.838>
- Soh, Y. N. A., & Elliott, S. (2014). An investigation of the stability of emerging new psychoactive substances. 6(7-8), 696-704. <https://doi.org/10.1002/dta.1576>
- Stanford, S. C. (2018). Recent developments in research of melatonin and its potential therapeutic applications. *British journal of pharmacology*, 175(16), 3187-3189. <https://doi.org/10.1111/bph.14371>
- Stone, J. (2018). A practical guide to sample preparation for liquid chromatography-tandem mass spectrometry in clinical research and toxicology. *Spectroscopy Europe*, 30(6).
- Tanaka, E., Kamata, T., Katagi, M., Tsuchihashi, H., & Honda, K. (2006). A fatal poisoning with 5-methoxy-N,N-diisopropyltryptamine, Foxy. *Forensic Science International*, 163(1), 152-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.11.026>
- Taylor, P. J. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*, 38(4), 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.007>
- Tolletaten. (2020). *Privat korrespondanse*.
- Tuv, S. S., Krabseth, H. M., Strand, M. C., Karinen, R. A., Wiik, E., Vevelstad, M. S., Westin, A. A., Øiestad, E. L., & Vindenes, V. (2016). New designer drugs from the web. *Tidsskriftet den norske legeforening*(8). <https://doi.org/10.4045/tidsskr.15.1276>
- Vaiano, F., Busardò, F. P., Palumbo, D., Kyriakou, C., Fioravanti, A., Catalani, V., Mari, F., & Bertol, E. (2016). A novel screening method for 64 new psychoactive substances and 5 amphetamines in blood by LC-MS/MS and application to real cases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, 441-449. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.009>
- Varì, M. R., Pichini, S., Giorgetti, R., & Busardò, F. P. (2019). New psychoactive substances—Synthetic stimulants. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Forensic Science*, 1(2), e1197. <https://doi.org/10.1002/wfs2.1197>
- Vindenes, V. (2021). *rettstoksikologi*. Store medisinske leksikon. Hentet 13. mars fra <https://sml.snl.no/rettstoksikologi>
- Waters. (2015). *Acquity UPLC Columns*. Hentet 22. januar 2021 fra <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001140en.pdf>
- Wohlfarth, A., Weinmann, W., & Dresen, S. (2010). LC-MS/MS screening method for designer amphetamines, tryptamines, and piperazines in serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(7), 2403-2414. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3394-4>

## 7. Vedlegg

1. Konsentrasjon og løsemiddel for 21 tryptaminer, s.72.
2. Retensjonstider for tryptaminer ved tre typer UHPLC-kolonner, s.73



Vedlegg 1: Konsentrasjon og løsemiddel for 21 tryptaminer

Forbindelse	Konsentrasjon [mM]	Løsemiddel	Dato	Produsent
4-AcO-DET	2,654	MeOH	1/6-18	Chiron AS
4-AcO-DMT	2,856	EtOH	10/6-16	Cayman Chemical Company
4-AcO-DiPT	0,59	MeOH	29/10-15	Cayman Chemical Company
4-AcO-MET	3,38	MeOH	6/1-17	Chiron AS
4-MeO-DMT	5,268	MeOH	30/4-19	Cayman Chemical Company
4-OH-DET	3,766	MeOH	1/6-18	Chiron AS
Psilosin	5,262	ACN	29/9-20	Chiron AS
4-OH-EPT	4,261	MeOH	8/10-19	Chiron AS
4-OH-MET	4,59	MeOH	6/10-15	Chiron AS
4-OH-MiPT	7,8653	EtOH/ACN (9:1)	2/11-20	Chiron AS
5-MeO-DIPT	2,91	MeOH	1/12-14	Cayman Chemical Company
5-MeO-DMT	2,689	MeOH	3/5-19	Cayman Chemical Company
5-MeO-DPT	1,251	MeOH	9/4-19	Cayman Chemical Company
5-MeO-EPT	2,2906	MeOH	2/11-20	Cayman Chemical Company
5-OH-DMT	0,8	MeOH	30/4-19	Cayman Chemical Company
DMT	1,062	MeOH	17/7-19	Cerilliant
EPT	2,8759	MeOH	2/11-20	Cayman Chemical Company
MET	1,717	MeOH	11/12-19	Cayman Chemical Company
MiPT	4,56	MeOH	10/6-16	Cayman Chemical Company
N,N-DMT-N-Oksid	5,506	MeOH	24/8-20	Chiron AS
Tryptamin	3,963	MeOH	12/2-18	Sigma

*Vedlegg 2: Retensjonstider for tryptaminer ved tre typer UHPLC-kolonner.*

Oversikt over de ulike tryptaminenes  $R_T$  ved de tre evaluerte kolonnene, BEH C18-, HSS T3 og Kinetex bifenyyl, vises nedenfor. Nummereringen nedenfor samsvarer med nummereringen av kromatografiske topper i figur 4.1.

### BEH C18

Nummer	Forbindelse	$R_T$	Nummer	Forbindelse	$R_T$
1	5-OH-DMT	1,11	8	MET	2,58
2	4-OH-DMT	1,57	9	4-AcO-DMT	2,59
3	4-OH-DET	1,84	10	4-OH-EPT	2,59
4	4-OH-MET	1,94	11	N,N-DMT-N-Oksid	2,67
5	Tryptamin	2,10	12	4-AcO-MET	2,86
6	DMT	2,23	13	4-MeO-DMT	3,03
7	5-MeO-DMT	2,37	14	4-AcO-DET	3,14

### HSS T3

Nummer	Forbindelse	$R_T$	Nummer	Forbindelse	$R_T$
1	5-OH-DMT	1,39	8	MET	2,87
2	4-OH-DMT	1,78	9	4-AcO-DMT	2,88
3	4-OH-DET	2,16	10	4-OH-EPT	2,88
4	4-OH-MET	2,21	11	N,N-DMT-N-Oksid	2,95
5	Tryptamin	2,36	12	4-AcO-MET	3,16
6	DMT	2,50	13	4-MeO-DMT	3,34
7	5-MeO-DMT	2,68	14	4-AcO-DET	3,45

### KINETEX BIFENYL

Nummer	Forbindelse	$R_T$	Nummer	Forbindelse	$R_T$
1	5-OH-DMT	1,54	10	4-OH-EPT	3,06
5	Tryptamin	2,13	14	4-OH-DET	3,08
2	4-OH-DMT	2,13	11	N,N-DMT-N-Oksid	3,10
4	4-OH-MET	2,55	8	MET	3,34
6	DMT	2,82	12	4-AcO-MET	3,47
7	5-MeO-DMT	2,94	13	4-MeO-DMT	3,73
9	4-AcO-DMT	3,06	14	4-AcO-DET	3,90



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

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway