

## Forord:

Denne oppgaven ble utført ved Avdeling for klinisk farmakologi ved St. Olavs Hospital i Trondheim og er et to-årig mastergradsstudium med studieretning ”Cellebiologi for medisinsk teknisk personell” ved Institutt for Biologi, Fakultet for Naturvitenskap og Teknologi ved Norges Teknisk Naturvitenskapelige Universitet (NTNU) i Trondheim.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til avdelingssjef Trond Aamo og min nærmeste overordnede Kjell Aarstad ved Avdeling for klinisk farmakologi for at jeg fikk frihet og fleksibilitet til å gjennomføre denne oppgaven. Jeg håper at oppgaven min kan bidra til noe positivt for avdelingen. Takk til Kjell Aarstad for hjelp til faglige spørsmål, og for at du alltid har vært til stede når jeg har søkt hjelp. Mine veiledere har vært Kolbjørn Zahlsen, seniorforsker ved Sintef Materialer og kjemi, Avdeling for bioteknologi, NTNU og Åse Krøkje, førsteamanuensis ved Institutt for biologi, NTNU. Takk til Kolbjørn for faglig og motiverende hjelp både i den tida du var min nærmeste overordnede ved Avdeling for klinisk farmakologi og etter at du startet som seniorforsker på Sintef, Institutt for bioteknologi. Selv i en travel hverdag tok du deg tid til å veilede meg på en positiv måte. Takk til Åse for veiledning og god hjelp til praktiske oppgaver. Du har tålmodig stilt opp hver gang jeg har bedt om hjelp. Til Dr. Rune Bang Leistad ved Avdeling for klinisk farmakologi vil jeg rette en spesiell stor takk for all god hjelp, velvillighet, tålmodighet og positivitet. Du har gitt meg motivasjon og tro på at dette skulle kunne gjennomføres. Jeg er utrolig takknemlig for at du har stilt opp og svart meg på mine utallige spørsmål. Til alle gode kolleger på Avdeling for klinisk farmakologi, Audhild, Trude og alle dere andre, takk for hjelp under den praktiske delen av studiet og for støttende ord underveis.

Sist, men ikke minst, har jeg satt pris på at min nærmeste familie, Arne og mine barn Mildrid, Torild, Jostein og Vegard har oppmuntret meg til å stå på, vist interesse for det jeg har holdt på med og gitt meg støtte og forståelse når det har røynt på. Dette har gitt meg motivasjon til å fullføre oppgaven.

Trondheim 14/9-2009

Wenche Rødseth Brede

# Sammendrag

## Hensikt og problemstilling:

Gasskromatografi-massespektrometri (GCMS) brukes ofte i laboratorier som utfører toksikologisk screening etter legemidler, giftstoffer og misbruksstoffer i biologiske prøver. Det kan imidlertid være en stor utfordring å identifisere ukjente stoffer i prøver med komplekse matrikser og ko-eluerende interferenser. Spesielt er dette et problem for detektering av stoffer i lave konsentrasjonsområder. Deconvolution-teknikk (DRS - Deconvolutioun Reporting Software) "løser opp" og ekstraherer spektra fra overlappende interfererende topper. Deretter sammenlignes ekstraherte spektra mot et referanse spekterbibliotek. I denne oppgaven undersøkes effekten av DRS og bruken av et retensjonstidslåst (RTL) bibliotek (FT-DBL – Forensic Toxicology Database Library). I tillegg sammenliknes bruk av en 15m DB-5 kolonne med en 30m HP-5 kolonne.

Tre problemstillinger ønskes besvart i denne oppgaven:

1. Vil en metode med deconvolution-teknikk og FT-DBL-RTL på en 15 m DB5 kolonne (ny metode) gi flere funn sammenlignet med en metode uten deconvolution-teknikk på en 30 m HP5- kolonne (gammel metode)?
2. Vil antall funn ved bruk av de to forskjellige kolonnene påvirkes av hvorvidt deconvolution-teknikk benyttes eller ikke?
3. Vil ny metode gi en gevinst med tanke på ressursbruk i forhold til gammel metode?

## Metode/eksperimentelt:

167 blodprøver fra rettsmedisinske obduksjoner ble ekstrahert, injisert og rapportert på to GCMS-instrument som var identiske med unntak av de faktorene som omfattes av undersøkelsens problemstilling.

## Resultater/Konklusjon:

1. Ved bruk av metode med deconvolution, FT-DBL-RTL og 15 m DB5- kolonne (ny metode) ble det registrert 40 % flere funn enn ved bruk av metode uten deconvolution på en 30 m HP5- kolonne (gammel metode).

2. Ved bruk av metode med deconvolution både på 15 m DB5- og på 30 m HP5-kolonne, ble det registrert 18 % flere funn med 15 m DB5-kolonne sammenlignet med 30 m HP5- kolonne. Ved bruk av metode uten deconvolution på 15 m DB5- og på 30 m HP5-kolonne, ble det ikke funnet forskjell i antall registrerte analytter.
3. Ved ny metode med deconvolution, FT-DBL-RTL og 15 meters DB5-kolonne ble kjøretid på instrumentet nesten halvert, og den totale analysetiden (instrumenttid og rapportering) ble redusert med 60 % i forhold til gammel metode uten deconvolution og 30 m HP5-kolonne.

# ABSTRACT

## **Aim of study:**

Gas chromatography - mass spectrometry (GCMS) is a frequently used tool in laboratories performing toxicological screening for pharmaceuticals, toxins and drugs of abuse in biological samples. However, it can be a challenge to identify unknown compounds in samples from complex matrices with co-eluting compounds. This problem especially occurs by detection of low concentrations of analytes. Deconvolution (DRS - Deconvolution Reporting Software) can "purify" and extract spectra free from interference from overlapping peaks. The extracted spectra are subsequently searched in a reference spectrum database. This study investigates the benefit from DRS and the use of a retention time locked (RTL) spectrum library (FT-DBL - Forensic Toxicology Database Library). In addition, the use of 15 m DB5 and 30 m HP5 capillary columns is compared.

The following three aims are investigated in this study:

1. Will methodology with deconvolution and FT-DBL-RTL and a 15 m DB5 column (new methodology) give positive identification of a higher number of compounds than methodology without deconvolution and a 30 m HP5 column (old methodology)?
2. Will the number of identifications for the two columns be influenced by the use of deconvolution or no deconvolution?
3. Will the new methodology give an improvement with respect to the use of time resources compared to the old methodology?

## **Methodology/experimental:**

In this study, 167 forensic blood samples were extracted, injected and reported from two identical GCMS instruments, the only differences being the factors investigated in the aim of study.

**Results / Conclusions:**

1. With the use of methodology with deconvolution, FT-DBL-RTL and 15 m DB5 column a 40 % higher number of compounds were identified compared to methodology without deconvolution and a 30 m HP5 column.
2. With the use of methodology with deconvolution on 15 m DB5 and 30 m HP5 columns, a 18% higher number of compounds were identified on a 15 m DB5 column than on a 30 m HP5 column. With the use of methodology without deconvolution on 15 m DB5 and 30 m HP5 columns, no difference was found in number of identified analytes.
3. With new methodology with deconvolution, FT-DBL-RTL and 15 m DB5 column, the instrument time was almost reduced with 50%, and the total time (instrument time and reporting time) was reduced with 60%.

# Innholdsfortegnelse:

1. Innledning	7
1.1 Introduksjon	7
1.2 GCMS generelt	8
1.3 Gasskromatografi	9
1.3.1 Injektor	9
1.3.2 Kolonne-kromatografi	10
1.3.3 Kromatografisk oppløsning (resolusjon)	11
1.3.4 Kolonne- og gasstype	12
1.4 Massespektrometri	13
1.4.1 Prinsipp for massespektrometri	13
1.4.2 Ionekilde	16
1.4.3 Masseanalysator	18
1.4.4 Detektor	20
1.5 Ekstraksjon av analytter, pKa- og logP-verdier	21
1.6 Programvare	22
1.6.1 Agilent MSD Productivity ChemStation	22
1.6.2 Bibliotekene NIST05, PMW-TOX og FT-DRS-RTL	24
1.6.3 AMDIS og deconvolution	24
1.6.4 DRS og fordelene ved biblioteksøk med DRS.	28
2. Problemstilling	30
3. Materialer, metoder, instrumenter.	31
3.1 Materialer, reagenser, utstyr og kolonner	31
3.2 Metoden	32
3.2.1 Metodeutvikling for opparbeiding/ekstrahering av prøver	33
3.2.2 Beskrivelse av metode	33
3.3 Instrumentene	35
3.3.1 Innstilling og avlesning på instrument med metode UTEN DRS	37
3.3.2 Innstilling og avlesning på instrument med metode MED DRS	38
4. Resultater	43
4.1 Deteksjonsgrenser og recovery	43
4.2 Ekstrahering av prøver	45
4.3 Kolonneforskjeller	52
5. Diskusjon	60
5.1 Fordeler med ny metode	60
5.2 Recovery-deteksjonsforsøk	61
5.3 Ekstrahering av 167 blodprøver fra obduksjoner	63
5.4 Kolonnens betydning	66
5.5 Kritiske faktorer	68
5.6 Fremtidige forbedringer av metoden MED DRS	70
6. Konklusjon	73
7. Referanser	74
Vedlegg	76

# 1. Innledning

## 1.1 Introduksjon

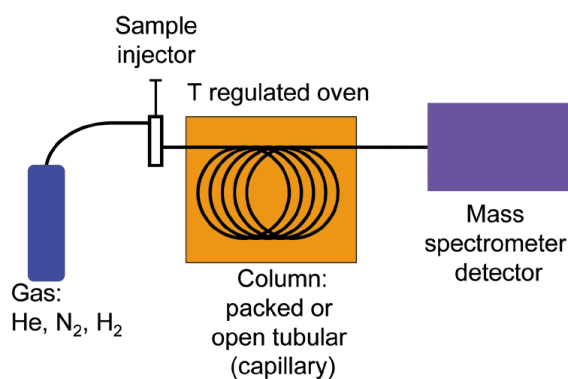
Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS) har i mange år vært en gullstandard innen rusmiddel- og toksikologisk screening. Det brukes en ioneringsteknikk som er svært stabil og reproduserbar. GCMS brukes både til full scan-analyser, hvor alle masser i et gitt område undersøkes, og til ”selected ion monitoring” (SIM) for å bekrefte og kvantitere prøver ved utvalgte masser. Følsomheten og selektiviteten for flyktige og temestabile forbindelser er svært god. Det er laget egne referansebibliotek for GCMS med over 200000 spektre av kjemiske substanser, og nye stoffer som dukker opp på markedet blir inkludert i bibliotekene. Disse kommersielt tilgjengelige bibliotekene blir sammenliknet mot de ukjente prøvene, og det kan gis et hurtig screening-svar. Andre instrumenter, som for eksempel Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS), har i dag ikke samme mulighet til biblioteksøk fordi det ikke brukes standardiserte ioniseringsteknikker. Analysetiden er lengre på GCMS enn andre teknikker, men til gjengjeld er ionesuppresjon (undertrykkelse/forstyrrelse av ioniseringsprosessen) et mye mindre problem, selv om det kan oppstå også for GCMS. Spesielt ved undersøkelse av komplisert matriks som blod, vevsvæsker, diverse homogenat etc. vil ionesuppresjon og overliggende, ko-eluerende kromatografiske topper gi usikker avlesning av spektre. Disse ko-eluerende stoffer forstyrrer hverandres massespektre og kan medføre at identifiseringen av stoffene mot referansebibliotek blir uriktig. Spesielt gjelder dette sporstoffer med små kromatografiske topper og lave konsentrasjoner, men også høye topper kan være kontaminerte og gi uriktige resultater.

Hensikten med denne oppgaven er å forbedre den massespektrometriske oppløsningen ved scan for å få svar på hver enkelt av de overliggende topper. En ny type programvare, ”Deconvolution Reporting Software” (DRS), bruker avanserte matematiske algoritmer for å ”løse” opp de ko-eluerende toppene i komplisert matriks. Deconvolution-teknikken kan skille overlappende, interfererende topper og skille støysignal fra reelt stoff-signal. Deretter sammenlignes hver av de rensede, ekstraherte toppene mot et eller flere referansebibliotek. DRS kan identifisere stoffer ved lave konsentrasjoner i kompleks matriks, topper som

tidligere er tatt som støy. Dessuten utprøves en DB-5MS-15 meters (DB5-15m) kolonne, som både er kortere og har en ny type stasjonærfase enn konvensjonell kolonne. Det kan gi både kortere analysetid og kapasitetsforbedringer. I tillegg brukes programvaren Forensic Toxicology-DataBaseLibrary (FT-DBL) som inneholder retensjonstidslåste (RTL) metoder og spekterbibliotek med 725 RTL stoffer. Rapporteringen i metoden MED DRS er automatisert. Denne metoden sammenlignes mot en tidligere brukt metode UTEN DRS, for å finne om DRS gir flere og sikrere stoff-funn. Samtidig brukes DB5-15m kolonnen for å halvere analysetiden. I metoden UTEN DRS brukes ikke deconvolution-teknikken og det benyttes en HP-5MS-30 meters (HP5-30m) kolonne. Denne metoden har en kombinasjon av automatisert/manuell avlesning mot bibliotek.

## 1.2 GCMS generelt

GCMS består av to sammenkoblede teknikker, gasskromatografi og massespektrometri. GC-delen injiserer prøven og separerer analytter i den kromatografiske kolonnen. Analytter transporteres med en gasstrøm gjennom kolonnen som er belagt med stasjonærfasen og videre til massespektrometret som detekterer analyttene. Et skjematisk oppsett av et GCMS system er vist i figur 1.



**Figur 1.** Skjematisk oppsett av et GCMS-system med gasstilførsel, injektor, temperatur-regulert ovn og massespektrometer [1].

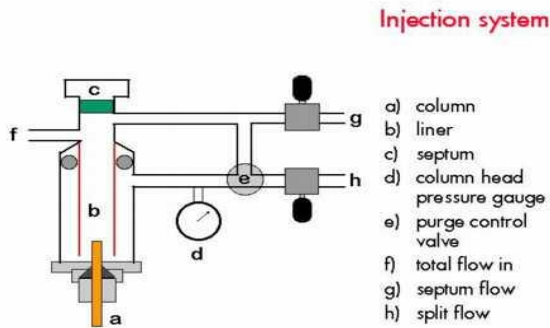


## 1.3 Gasskromatografi

Den gasskromatografiske delen av analysen innledes ved at det injiseres ferdig ekstraherte prøver på GC-delen av instrumentet. Det kan injiseres væske- eller gassfase fra prøvene, og komponentene separeres kromatografisk i en kapillærkolonne, før de går inn i massespektrometeret.

### 1.3.1 Injektor

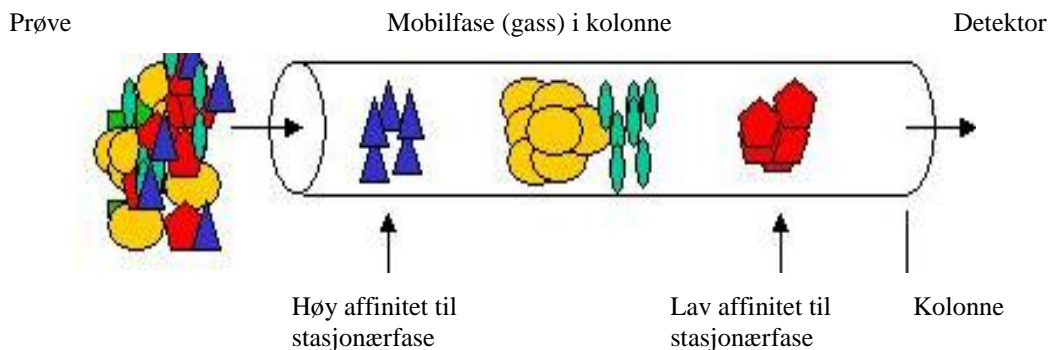
De fleste gasskromatografer er utstyrt med fordampingsinjektor som tillater injeksjon av væske eller gass (figur 2). Analyttene transporteres videre til kolonnen hvor de skal separeres. Injektortemperaturen er viktig for å få til en effektiv fordampning, men de minst flyktige analytter kan bli værende igjen i injektoren. Dette kalles injektordiskriminering og er en begrensning for stoffer som kan analyseres på GCMS. Noen stoffer må gjennomgå derivatisering for å kunne detekteres på GCMS. Dette innebærer at et reaktivt stoff (derivatiseringsmiddel) bindes til analytten ved høy temperatur for å gjøre den mer flyktig. Dessuten må analytter være termostabile, det vil si at de ikke bli ødelagt av høy temperatur i injektor eller på kolonnen. GCMS-injektoren har to hovedtyper injeksjon, split- og splitless-injeksjon. Ved splitinjeksjon kommer bare en mindre del (1-5 %) av prøven inn på kolonnen. Splitinjeksjon brukes dersom prøver har høye konsentrasjoner av analytter og på hurtige og isoterme (konstant kolonnetemperatur) analyser. Ved SIM-analyser brukes oftere splitinjeksjon ettersom følsomheten/deteksjonen er mye bedre ved SIM enn ved scan. Ved splitless injeksjon blir hele prøven som er injisert ført inn på kolonnen. Denne type injeksjon brukes ved scan der det er ukjente mengder stoff i prøvene for å øke analysefølsomheten [2].



**Figur 2.** Skjematisk injeksjonssystem på GCMS. Prøven blir injisert i injeksjonsporten ved septum (c), prøven fordampes i liner (b) og går videre inn i kolonnen (a). Mobilfasen, som er en gass, kommer inn ved f, og trykket blir regulert ved et ventilsystem (d, e). Septum blir vasket av septum flow (g), og split flow (h) regulerer split/splitless-injeksjon [3].

### 1.3.2 Kolonne-kromatografi

Ved starten av kolonnen blir analyttene kondensert og oppkonsentrert. En temperaturgradient i kolonnen starter lavt, ca 50-70 (100) °C og øker opp til 300-325 °C. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med en hastighet som er bestemt av deres flyktighet, løselighet i stasjonærfase og temperatur i ovnen. Når temperaturprogrammet starter begynner analyttene å fordampe og beveger seg med gasstrømmen utover i kolonnen (figur 3) og eluerer mot detektor.



**Figur 3.** Prinsipp ved gasskromatografi. Prøven kommer i gassform fra injektor inn på GC-kolonnen. Der vil stoffer kondenseres og deretter separeres alt etter hvilken affinitet de har til stasjonærfasen. Stoffer med høy affinitet vil "feste" seg i lengre tid til kolonnen, eluerer senere og får lengre retensjonstid enn stoffer med lav affinitet.

Flere faktorer kan påvirke GC-separasjonen, blant annet:

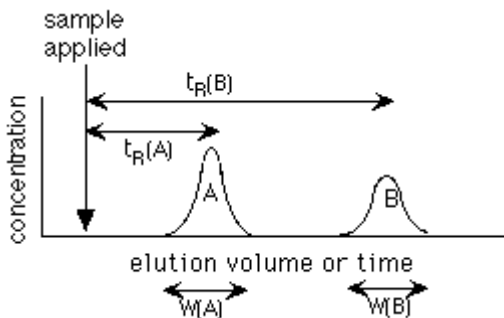
1. Flyktighet av stoffet. Stoffer med lavt kokepunkt vil gå hurtigere gjennom kolonnen enn stoffer med høyt kokepunkt.
2. Analytters polaritet og kolonnetype. Polare stoffer har mer retensjon i polare kolonner, upolare i upolare kolonner. Interaksjon med stasjonærfasen gjør at stoffer holdes igjen i kolonnen før de elueres. Stoffer med høy affinitet til stasjonærfasen går saktere gjennom kolonnen enn de med lav affinitet.
3. Kolonnetemperatur, gasshastighet og kolonnenlengde påvirker alle elueringshastigheten og dermed separasjonen [4].

### 1.3.3 Kromatografisk oppløsning (resolusjon)

Hensikten med kromatografi er å få en best mulig separasjon av stoffer som elueres fra kolonnen. Et mål for separasjonen er gitt ved oppløsningsevnen eller resolusjonen,  $R$ . Denne er definert som avstanden mellom båndsentrene,  $(t_R)_B$  og  $(t_R)_A$  delt på den gjennomsnittlige båndbredden (toppbredden),  $\frac{1}{2} \cdot (W_A + W_B)$ .

$$R = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$(t_R)_B$  og  $(t_R)_A$  er retensjonstidene for toppene A og B, mens  $W(A)$  og  $W(B)$  er båndbredden for toppene A og B.



**Figur 4.** Parametre for oppløsning (R) er retensjonstiden  $(t_R)_B$  og  $(t_R)_A$  og båndbredden  $W(A)$  og  $W(B)$ . Effektiviteten av separasjonene av to komponenter er gitt av R [5].

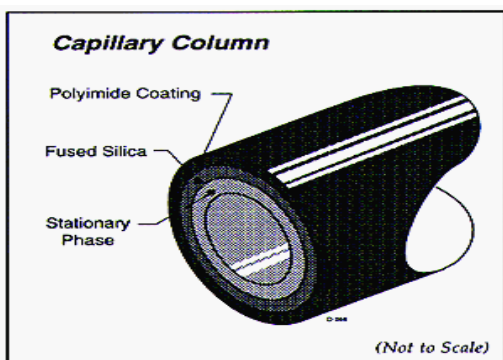
Større verdier av R gir bedre oppløsning, lavere R gir dårligere oppløsning. Akseptabel oppløsning er ved  $R=1$  mens ved  $R > 1,5$  er det grunnlinjeseparasjon. De ulike parameterene som påvirker oppløsningen er retensjonstiden og båndbredden. Dette er vist skjematisk i figur 4. For å regulere oppløsningen, kan kolonnetemperatur, mobilfase-sammensetning og stasjonærfasetype endres [2].

### 1.3.4 Kolonne- og gasstype

Kolonnenes hovedoppgave er å separere analytter slik at de elueres som adskilte topper. Valg av type stasjonærfase i kolonnen og kolonnetemperatur- og gradient er de viktigste variablene for å kontrollere separasjon, retensjon og kvalitet på topper. Mobilfasen, eller bæregassen, ved gaskromatografi har til hensikt å frakte disse flyktige stoffer gjennom kolonnen. Gassen må være inert, det vil si at den ikke reagerer med prøven eller stasjonærfasen i kolonnen. De mest

brukte bæregassene er helium, nitrogen og hydrogen. Valg av bæregass vil også påvirke effektivitet/oppløsning og analysetid.

Til GCMS kan det brukes både pakkede kolonner (pakkemateriale jevnt fordelt i kolonne) og kapillærkolonner. Når det gjelder pakkede kolonner, vil kapillærkolonner gi smalere og høyere toppar, høyere signal/støy (S/N) -forhold og bedre selektivitet. Valget av kapillærkolonne til gasskromatografien avhenger av hvilke typer stoffer som skal undersøkes og av analyttenes polaritet, flyktighet og termolabilitet. Upolare, flyktige og termostabile stoffer med kapillærkolonne egner seg bra på GC. Kapillærkolonnen kalles "wall-coated open tubular column", WCOT, og har en polyimid-coating på utsiden av kolonnen for å unngå at den skal brette, stasjonærfasen er på innsiden av kolonnen (figur 5). Det er to typer stasjonærfase i kapillærkolonnene, gas-solid-chromatography (GSC), der stasjonærfasen er et adsorpsjonsmiddel, og gas-liquid chromatography (GLC) der stasjonærfasen er en ikke-flyktig væske. GLC er den mest brukte kolonnen. Kolonnene har indre diameter 0.1-0.4 mm og kan være 15-60 m lange [2].



**Figur 5.** Snittet av en silica (Fused Silica)-kapillærkolonne. Silica-kolonnen er ytterst belagt med et polyimid-lag som beskyttelse. Innenfor silicaen er stasjonærfasen [6].

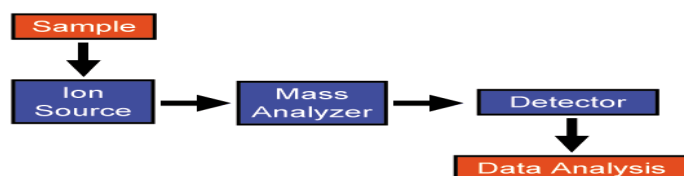
## 1.4 Massespektrometri

### 1.4.1 Prinsipp for massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analytisk teknikk som involverer studie av ioniserte molekyler i gassfase med det mål å finne molekylvekt, fragmenteringsenheter, struktur og gassfasereaktivitet av stoffer. Dette brukes til kvalitativ og kvantitativ analyse av komponenter i forskjellig matriks. Den viktigste egenskapen massespektrometret har er at det kan innstilles på bestemte analytters molekyl- ( $M^+$ ) og fragmenterings-ioner slik at en selektivt "ser" kun de analytt-ioner en ønsker å bestemme. Derved kan en få meget høy spesifisitet for disse stoffene, og risikoen for at andre forbindelser interferer med analysen er svært lav.

GCMS brukes blant annet til full scan analyse. Ved denne analyseformen registrerer massespektrometret alle masse/ladning ( $m/z$ ) -ratio innen et visst område, for eksempel  $m/z$  40-700. Alle analytter i prøven blir fragmentert og registrert og gir opphav til forskjellige spektrere avhengig av analyttenes kjemiske egenskaper. Det blir dannet et eget unikt og reproduserbart mønster for hver analytt som danner grunnlaget for et spekterbibliotek. Spekterbibliotekene blir brukt som referanse ved analyse av ukjente prøver, og det blir gitt en rangert liste med forslag til hva det ukjente stoffet kan være. Full scan er en kvalitativ analyse, og en kvantitativ bestemmelse må gjøres ved SIM-analyse og sammenlignes mot kalibreringskurve.

Massespektrometret består av tre deler: ionekilde, masseanalysator og detektor som skjematisk er vist i figur 6. I tillegg injiseres prøven inn i ionekilden fra forskjellige enheter, for eksempel fra en gass- eller væskekromatografisk enhet. En dataanalyseenhet bearbeider resultater som kommer fra detektoren.



**Figur 6.** Hovedenhetene i et massespektrometer. Prøven blir ført inn i ionekilden, hvor kjemisk nøytrale stoffer blir ionisert, ionene fragmenteres eller blir på ladet molekylform ( $M^+$ ) og sendes videre til masseanalysatoren. Masseanalysatoren sender videre alle ionene (full scan) eller bare utvalgte ioner (SIM). Ioner som får passere blir registrert i detektoren og rapporteres i data-analysen [7].

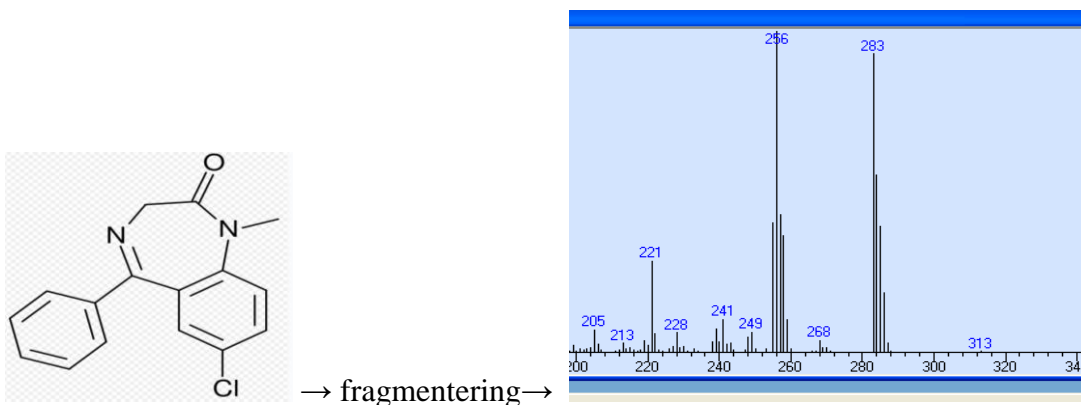
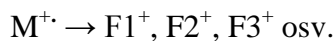
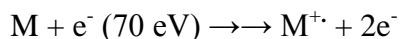


## 1.4.2 Ionekilde

MS-prinsippet består i å ionisere kjemiske, nøytrale stoffer i vakuum for å generere ladete molekyler eller ladde fragmenter for deretter å måle deres  $m/z$ -ratio i en masseanalysator. Vakuomet i ionekilden er dannet ved hjelp av en diffusjons- eller turbopumpe. Vakuum benyttes for å sikre et fragmenteringsmiljø som er mest mulig fritt for andre molekyler. Ved gasskromatografi er det brukt inert gass som ikke påvirker fragmentering i ionekilden. Ladningen på de fleste stoffer med molekylvekt  $<1000$  amu ( $1$  amu er vekten på  $1$   $H^+$ ) vil som oftest bli  $1$ , men den kan også være  $>1$ . Om ionets masse for eksempel er  $300$  og har ladningen  $1$ , vil  $m/z$  være  $300/1$ , altså  $300$ . Om ladningen hadde vært  $2$ , ville  $m/z$  vært  $300/2$ , altså  $150$ . Ioniserings-teknikken kan variere på grunn av blant annet stoffenes termolabilitet, flyktighet og polaritet. Forskjellige ioniseringsteknikker som er mye brukt er elektronionisering (EI), kjemisk ionisering (CI), Fast Atom Bombardment (FAB), Electrospray ionisation (ESI) og Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI).

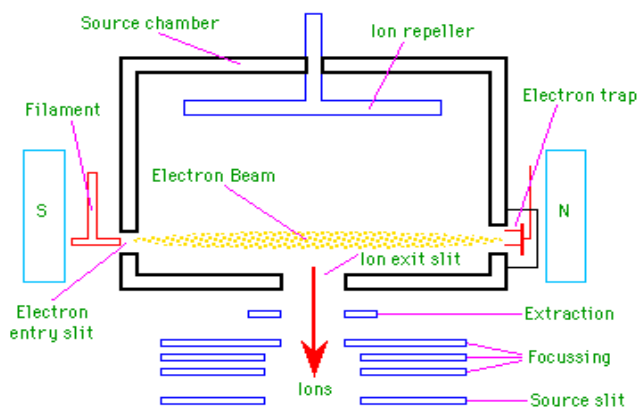
For stoffer som er termostabile, upolare og flyktige, brukes ofte EI eller CI ved GCMS. Ved EI ( $70$  eV) blir en elektron-stråle fra en glødetråd sendt mot stoffene, som gjør at et elektron blir spaltet av molekylet, og det blir dannet et moder-molekyl-radikal-ion ( $M^+$ ), som er positivt ladet og energirikt. En del av  $M^+$ -radikal-ionene vil fragmentere til positive ioner ( $F1^+$ ,  $F2^+$ ,  $F3^+$ ), noen forblir som molekyl-ioner,  $M^+$ . Ionene og spekteret som dannes er spesifikt for molekylet. Det er denne fragmenteringen som er reproducerbar og gjør EI på GCMS-instrumentet egnet ved scan-analyser. Et eksempel på molekyl- og fragment-ioner er vist i figur 7.





**Figur 7.** Diazepam fragmenteres i ionekilden, og de to største ionene er fragmentene  $m/z$  256 og  $m/z$  283 (spekter fra Chemstation).

Etter ionisering og fragmentering vil de positivt ladde ionene bli skjøvet ut fra ionekilden av en positivt ladet ion-repeller (figur 8). Ionene aksellerer via et linsesystem som fokuserer ionene slik at de skal treffe masseanalysatoren.

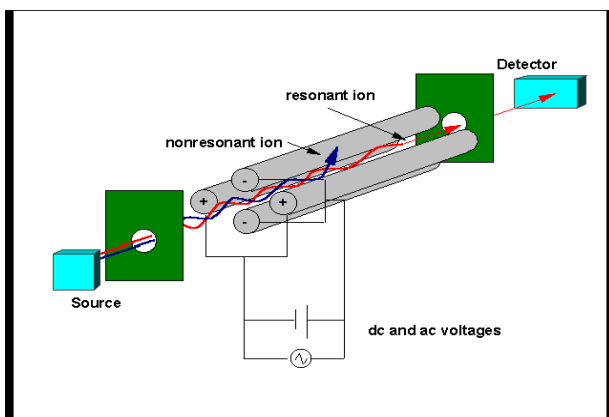


**Figur 8.** Skjematisk oppsett av en ionekilde. Molekyler som kommer inn i ionekilde blir bombardert av en elektronstrøm fra "Electron entry slit" som "slår av" et elektron fra molekylet. Det blir dannet et positivt radikalion,  $M^+$ , som er svært energirikt. En del av  $M^+$  fragmenterer og danner både mindre ioner og  $M^+$ . Den positivt ladde "repeller" i ionekilden vil skyve de positive ioner fra seg mot "Ion Exit Slit", hvor ionene blir fokusert via et linsesystem før de går til kvadrupolen og blir sortert [8].

### 1.4.3 Masseanalysator

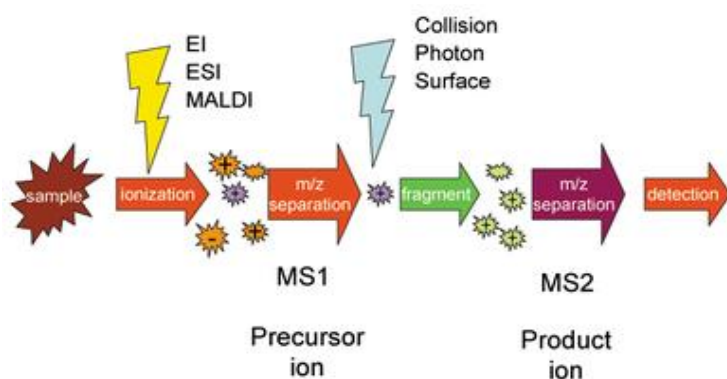
Fra ionekilden vil de ladde partiklene bli transportert gjennom masseanalysatoren, kalt kvadrupolen, som også er i vakuum. Den separerer ioner basert på  $m/z$ -forhold. Eksempler på forskjellige typer av masseanalysatorer er kvadrupol, magnetinstrument og TOF.

Et kvadrupolinstrument består av fire parallelle elektroder som er sirkulær eller hyperbolsk formet. Elektrodene pålegges varierende vekselstrøm (radio-frequency, RF) og likestrøm (direct current, DC). To og to staver har samme potensial, og spenningen alternerer mellom elektrodene (figur 9). De positive  $m/z$ -ionene som er dannet i ionekilden blir fokusert via et linsesystem inn til kvadrupolen og fokuseres i retning parallelt med elektrodene. Ionene vil tiltrekkes av elektrodene som har motsatt ladning, og når ladningen alternerer mellom disse, vil ionene oscillere gjennom kvadrupolen slik som vist på figur 9. Den tilførte spenningen påvirker banen til ionene i massefilteret, og for en gitt spenning er det bare ioner med en spesiell  $m/z$ -ratio som får passere kvadrupolfilteret (resonant ion). De andre ionene vil kastes ut og ikke nå detektoren (nonresonant ions). Ionene sorteres altså ut ved regulering av det elektriske feltet. Ved full scan blir alle ioner stabilisert og sluppet gjennom til detektoren, mens ved SIM-analyse selekteres ionene.



**Figur 9.** Skjematisk tegning av kvadrupol masseanalysator. Ioner fra ionekilde sendes til kvadrupol hvor de blir selektert ut etter hvilken  $m/z$  de har. De fire elektrodene i kvadrupol blir pålagt spenning, to og to har alternerende polaritet og vil skiftevis tiltrekke og skyve fra seg positive ioner. Ved å regulere spenningen over elektrodene slippes noen ioner gjennom (resonant ion) og noen ioner blir skjøvet ut (nonresonant ion) [9].

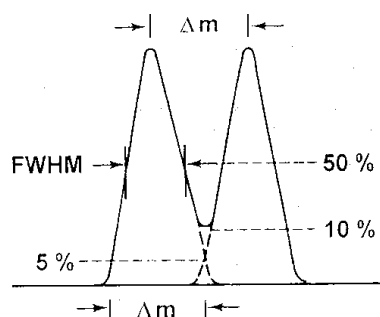
Triple Quadropole (QqQ) er et tandem massespektrometer som består av to kvadropole massefiltre i serie, MS1 og MS2, med en "RF-only" (bare vekselstrøm)-kvadropol mellom disse to. RF-only-kvadrupolen filtrerer ikke ioner, men den fungerer som ei kollisjonscelle som bruker en inert gass, for eksempel N<sub>2</sub>, He eller Argon for å skape kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) av et utvalgt fragment (precursor-ion) fra MS1. Fragmenter fra RF-only-kvadrupolen blir så sendt til MS2 hvor de blir filtrert eller utvalgt til scanning (product-ion). Trippelkvadropol-instrumentet øker sensitiviteten i forhold til singel-MS med en faktor 10. Figur 10 viser skjematisk en trippelkvadropol.



**Figur 10.** Skjematisk framstilling av en trippelkvadropol. Molekyler blir fragmentert og sendt til MS1. Der blir de beste fragmenter (precursor-ion) sortert ut og sendt til en RF-only-kvadropol som ved hjelp av kollisjonsindusert dissosiasjon (CID) lager nye fragmenter av precursor-ionene. Disse går videre til MS2 kvadrupolen hvor de ønskede ioner (production) blir filtrert ut og sendt til detektoren [10].

I et magnetinstrument separeres m/z-ioner i et magnetfelt ved å variere magnetfeltet. Dette instrumentet gir spesielt god oppløsning. I et ionfelleinstrument (iontrap) utgjør ionekilden og masseanalysatoren en felles enhet, ellers er prinsippet som i et kvadropolinstrument ved at masser sorteres ut etter variasjon av RF/DC. TOF-instrumentets ioner akselleres i pulser, får samme kinetiske energi og ledes gjennom et feltfritt rør. Ionene vil bevege seg med en hastighet som er proporsjonal med kvadratroten av ionets masse, og massen bestemmes av flyvetiden og detekteres ved enden av røret [11].

De forskjellige typer masseanalyser har ulike egenskaper, og bruksområdene avgjør hvilke type en skal velge. Oppløsningen, det vil si evnen analysatoren har til å skille massene fra hverandre, er varierende. Oppløsningen er definert som  $R=m/\Delta m$ , hvor  $m$  er massen som er av interesse og  $\Delta m$  er avstanden til neste masse. Høy verdi av  $R$  indikerer god separasjon av topper. Instrumenter kalles lavoppløselig dersom de har oppløsning  $< 2000$ , høyoppløselig  $>5000$ . Det er flere måter å indikere oppløsningen på. Den mest vanlige er å bruke  $\Delta m$  av toppen ved halv høyde, "Full Width at Half Maximum" ( $R_{FWHM}$ ) eller ved 10 %,  $R_{10\%}$  (figur 11) [11].

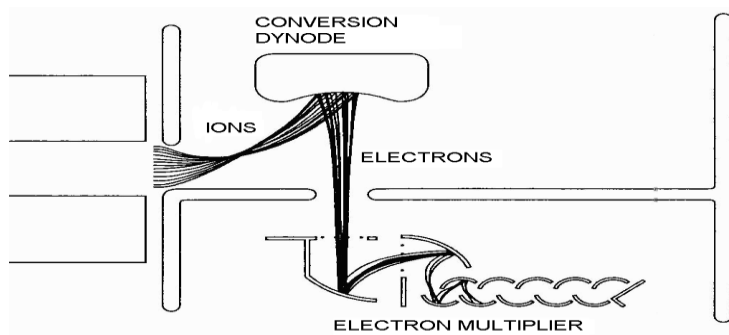


**Figur 11.** Illustrasjon av definisjoner på oppløsning.  $R_{FWHM}$  benytter  $\Delta m$  ved 50% av høyden og  $R_{10\%}$  benytter  $\Delta m$  ved 10 % av høyden. Begge har formelen  $R=m/\Delta m$  [11].

#### 1.4.4 Detektor

Detektoren registrerer ioner som kommer ut av masseanalyseren. Type detektor er avhengig av hvilket instrument og type masseanalyser en har. Ved for eksempel kvadropolinstrument brukes en High Energy Dynode (HED, Conversion Dynode) og en elektronmultiplikator (EM)-detektor som er formet som et horn. Som i ionekilden og masseanalyseren er det høyvakuum i detektoren ( $10^{-6}$  Torr). De positive ionene som kommer ut fra massefilteret vil sendes mot en HED som er lokalisert ikke-aksialt på massefilteret (figur 12). Dette gjøres for å minimalisere støy-signaler som fotoner, nøytrale ioner og elektroner som opprinnelig kommer fra ionekilden. Positive ioner blir trukket mot HED, elektroner blir emittert og trukket mot det mer positive EM-hornet. Når hvert elektron treffer siden i hornet, vil dette frigjøre flere elektroner som utløser en kaskade av elektroner. Antall elektroner som er frigjort

er proporsjonal med antall ioner som opprinnelig traff HED. På denne måten blir signalet forsterket, og detektoren sender resultatet til dataanalysatoren. Figur 12 viser skjematisk hva som skjer i detektoren.



**Figur 12.** Skjematisk framstilling av det som skjer i detektoren. De positive ioner som kommer ut fra kvadropolen blir sendt til HED som er negativt ladet. HED vil emittere elektroner som vil sendes videre til den mer positive elektronmultiplikator (EM). Her vil det utløses en kaskade av elektroner for hvert elektron som treffer EM, og det blir en forsterking av signalet [12].

## 1.5 Ekstraksjon av analytter, pKa- og logP-verdier

Før de forskjellige typer prøver kan injiseres i et GCMS-instrument, må de forbehandles for å ekstrahere og oppkonsentrere de aktuelle analyttene i et egnet medium. Det er viktig å finne de rette betingelser for ekstraksjonen. Ofte er det svært lave konsentrasjoner av analytter og derfor viktig å bruke en ekstraksjon som gir best mulig utbytte for de fleste av analyttene. De forskjellige medikamentene varierer mye både angående molekylvekt (MW), surhet (pH/pKa), molekylstruktur, stoffets polaritet (logP) og flyktighet av stoffet. pKa-verdien er den negative logaritmen til syrekonstanten og sier noe om dissosiering av  $H^+$ -ioner i en syre. LogP-verdi forteller hvor lipofil en analytt er og er funnet på grunnlag av fordeling av analytten i et tofasesystem, oktanol og vann.

Generelt ved ekstraksjon av komplisert prøvematriks bør en kjenne til analyttenes pKa- og logP-verdier. Ved væske-væske ekstraksjon fra prøve (vandig fase) til organisk fase, er det viktig å dekke pKa-området fra 3-11 fordi de aller fleste rus- og legemidler har pKa-verdier i

dette området. For å få analytter til å gå over i en upolar organisk fase, må de over på en ikke-ionisert form, oftest ved hjelp av passende buffere og ekstraksjonsløsning som har en logP som passer for overgangen av disse analyttene. For å dekke hele pKa-spekteret fra 3-11 gjøres det både en sur og en basisk ekstraksjon. Etter ekstraksjon oppkonsentreres (10x) prøvene ved inndamping av organisk materiale før de injiseres i GCMS-instrumentet [13].

## 1.6 Programvare

Et GCMS-instrument innehar mye forskjellig programvare for å bearbeide data som blir samlet under analysen. I denne oppgaven benyttes Agilent Chemstation D.02.00 SP1 som inkluderer programvare for RTL og Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification Software (AMDIS), FT-RTL-database og bibliotek, Pfleger, Maurer, Weber (PMW)TOX-bibliotek, NIST05-bibliotek og DRS-programvaren.

### 1.6.1 Agilent MSD Productivity ChemStation

Agilent Chemstation er en programvare for Agilents instrumenter. Denne programvaren kan brukes i flere instrumenter som GC, GCMS, LC, LCMS. Det er en fleksibel programvare som passer for applikasjoner innen industri, for produktutvikling og til kvalitetskontroll, kvalitativ og kvantitativ analyse innen kjemi og medisin. Dette er en fullt integrert programvare som har applikasjoner for alle typer oppgaver som er assosiert med GCMS datainnsamling, dataprosessering og rapportering. Den forenkler den analytiske prosessen fra prøven kommer inn i GC til den endelige rapporten. Det gir også muligheten til å implementere forskjellige typer verktøy, for eksempel biblioteksøk, for å forbedre produktiviteten. Chemstations automatiske bibliotek-søk er et Probability Based Matching (PBM)-søk. PBM-søk gjøres mot kondenserte spektra. Når det lages et kondensert spekter av et stoff, er det en PBM algoritme som finner de mest signifikante topper i et spekter. Dette spekteret blir lagt i biblioteket, og brukes i en PBM-søkerutine mot de ukjente spektre (dette til forskjell fra NIST-søk som er et søk mot fullt spekter).



## 1.6.2 Bibliotekene NIST05, PMW-TOX og FT-DRS-RTL

National Institute of Standards and Technology (NIST05) bibliotek og søkeprogram er et massespektralt referansebibliotek som er laget ved at ca. 200000 forskjellige stoffer er analysert på GCMS og spektre funnet. Elektronioniseringen med filamentspenning på 70 eV er standard i EI-NIST05-biblioteket. Dersomm EI-spenningen forandres, vil fragmentering og dermed også spektre forandres. Derfor er det viktig at det er standardiserte, stabile og sammenliknbare forhold for søk mot biblioteket. Alle opplysninger som masse-spekter, navn, formel, molekylstruktur, molekylvekt, CAS-nr, synonymer, retensjonsindeks (RI) blir lagt inn i bibliotekene. NIST05-og Pflieger, Mauer, Wiley (PMW) TOX-EI-bibliotekene fokuserer på medikamenter, rusmidler -og toksikologiske stoffer, pesticider, organiske stoffer i jordsmonn, vann og luft, forurensninger, aminosyrer, peptider og derivater av disse. De fleste av stoffene er overlappende i de to bibliotekene, men navnsetting på en del stoffer er forskjellig. Funn i det ene biblioteket kan ”bekreftes” i det andre.

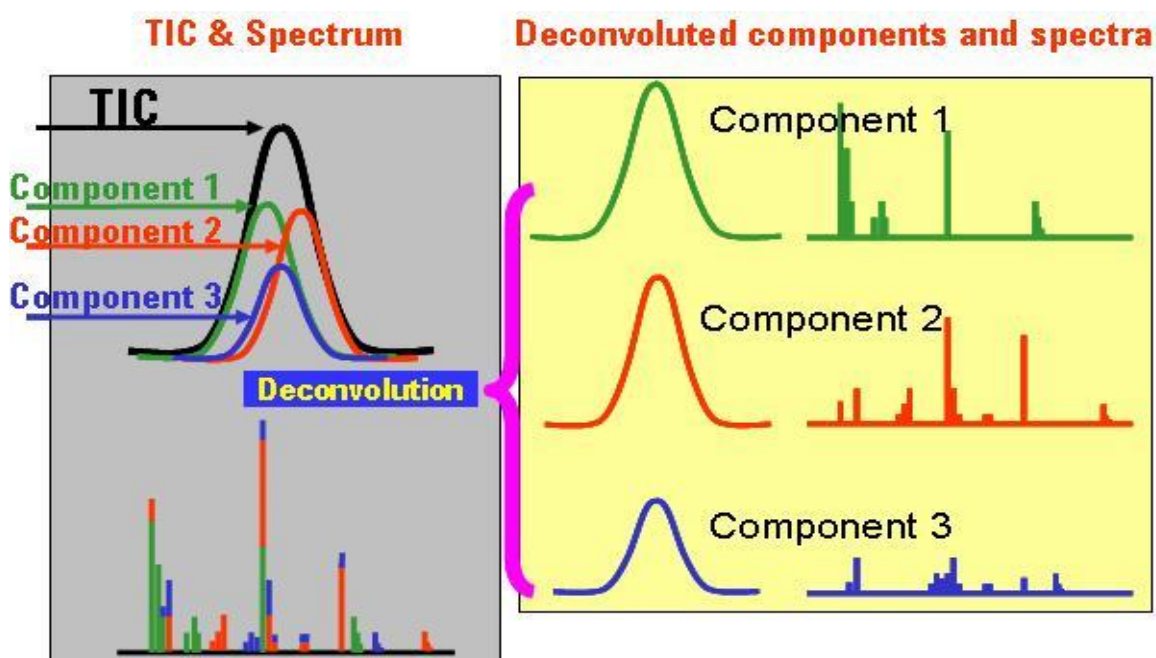
Forensix Toxicology Retention Time Locking Deconvolution Resolving Software-database-library (FT-RTL-DRS-DBL) inneholder 725 forskjellige rus- og legemidler. Databasen inneholder i tillegg RTL-metoder for DB5-MS og DB35-MS-kolonner og spekterbibliotek for DRS og MSD Chemstation. RTL-programvare er en applikasjon til MSD ChemStation programvare som kan reprodusere retensjonstiden fra et GCMS-system til et tilsvarende system med samme nominelle metode og kolonne, uavhengig av detektortype. Ved å justere inlet-trykket på kolonnen via electronic pressure control (EPC), som er en interaktiv del av Chemstation software, vil RT holdes konstant. Alle bidrag til forandring av RT som vedlikehold, recalibreringer, kutting av kolonne etc, vil også bli forenklet ved bruk av RTL [14].

## 1.6.3 AMDIS og deconvolution



AMDIS er en integrert del av Chemstation utviklet av National Institute for Standards and Technology (NIST). AMDIS benytter deconvolution som ”løser opp” topper og er spesielt konstruert for å finne stoffer i lave konsentrasjoner i ”skitten” matriks. Det er et integrert sett med prosedyrer og matematiske algoritmer som ekstraherer ut spektrene i topper, for deretter å sammenligne disse mot et referansebibliotek (figur 13).

Opprinnelig var AMDIS utviklet for deteksjon av kjemiske våpen i komplekse matriks som var i miljøet eller i kjemiske prosesser. Hensikten med mest mulig automatisering her var å minske sjansen for at sensitiv informasjon skulle bli avslørt. I dag er AMDIS utbredt og er et utmerket hjelpemiddel i GCMS-analyser av kompliserte matriks-prøver.



**Figur 13.** Figuren viser at det er tre topper med forskjellig RT som tyder på at det er tre forskjellige stoffer tilstede. Deconvolution-algoritmene ekstraherer og løser opp toppen ved å lete etter toppmaksimum og ionelikheter i spekteret. Disse individuelle spektra blir sammenlignet mot referansespektra [15].

Deconvolution defineres som en ekstrahering av signal fra en kompleks blanding. Støy, korrigerende av basislinje-drift og ekstrahering av nære ko-eluerende topper hører til deconvolution-prosessen. Hele prosessen innebærer fire trinn:

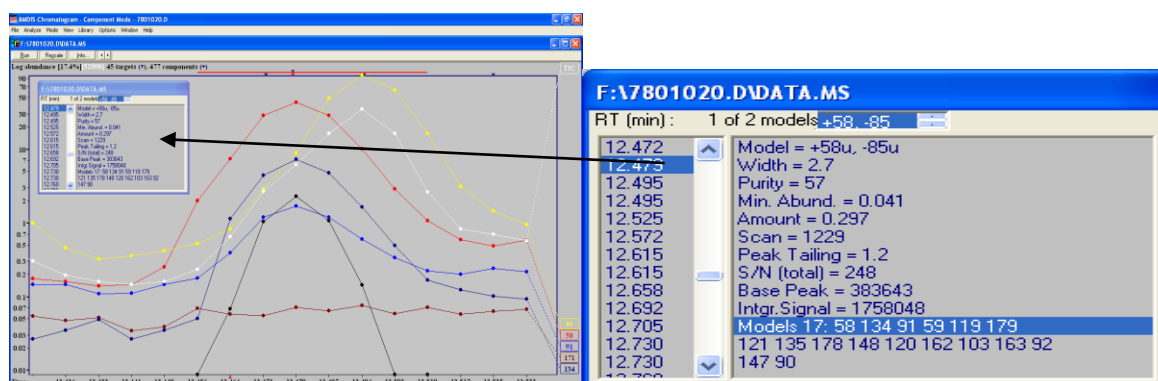
1. Analyse av støy: Før den spektrale analysen blir det etablert parametre for å skille hva som er støy og hva som er signal, og signal/støy-forhold blir sjekket.
2. Detektering av mulige stoffer: Det individuelle stoffet spores, og modell-topp for hver komponent bestemmes.
3. Deconvolution: Renset spekter blir ekstrahert fra det individuelle ionkromatogrammet, eventuelt nærliggende komponenter blir trukket fra.
4. Identifisering av stoff: En treff-faktor blir utregnet for det ekstraherte spekter mot spekter i et referansebibliotek. All informasjon samlet i deconvolution-prosessen blir brukt, og en "hit" liste viser treffene.

Etter støyanalysen, bruker deconvolution en modelltopp-metode for å ekstrahere (deconvolutere) topper fra kompliserte kromatogram. Modelltopper dannes ved at alle ioner i hele datafila blir undersøkt med henblikk på maksimering av ioner til samme tid, innen 0.1 scan. Det maksimale ionet som har best skarphet (raskest stigning og fall) og ioner som maksimerer innen 0.1 scan med lignende skarphet, blir brukt som modelltopp. Det korte tidsintervallet er viktig for å unngå at støy eller ko-eluerende stoffer skal interferere. Ioner som maksimerer likt innen +/- 0.1 scan av ionet med maksimum skarphet blir tatt med videre i prosessen. Alle m/z-ratio i datafila blir undersøkt og får sine modeltopper. Når en kromatografisk topp skal undersøkes vil denne bli sammenlignet med modelltoppen, og tid og form må stemme. Formen på hvert ion fra modelltoppen blir sammenliknet med formen på den ukjente toppen. Deretter blir skarpheten av ionene sammenliknet med modelltoppen for å finne ut om det er en ren topp fri for ko-eluerende stoffer.

Det er viktig å finne eksakt tid og maksimum for modelltoppen. Til dette brukes informasjonen om støyforhold, dessuten må toppene korrigeres for "skewing" som er en spektral forskyvning av spektra i kvadropolinstrumenter. Tiden det tar å scanne alle m/z - ratioer kombinert med variasjon av analyttkonsentrasjon i løpet av stoffeluring gir skewing.

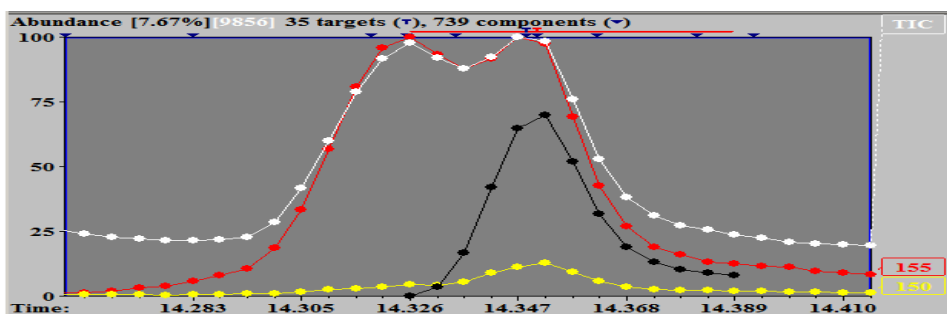
Dersom ett scan fra masse 40 til 700 tar 500 millisekund, og analyttkonsentrasjonen forandres betydelig i løpet av denne tida, vil det resulterende spektrum bli forstyrret. Både støy-nivå og skewing blir korrigert for automatisk i AMDIS.

Modelltoppene er også avhengig av hvilken innstilling i AMDIS parametrene sensitivitet og oppløsning får. Parametrene må velges før instrumentet analyserer prøvene. Sensitiviteten påvirker hvor små topper AMDIS vil akseptere. Oppløsningen bestemmer hvor nær i tid noen ionemaksimum kan være før det blir bestemt at det er forskjellige komponenter. For å finne formen på stoffet brukes alle ioner som har en skarphet som er >75 % likhet med modell (se figur 14).

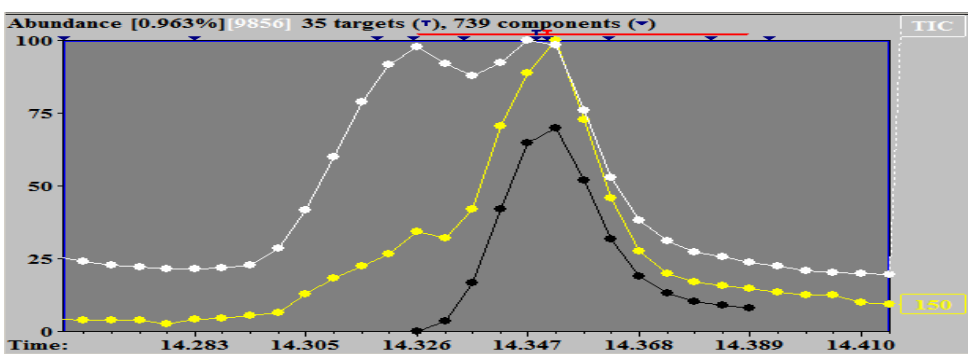


**Figur 14.** Kromatogram til venstre er fra AMDIS og viser modell-topp (sort), ion 58 (rød), ion 134 (mørk blå), ion 91 (mellomblå), ion 85(gul) er støy. Figur til høyre viser opplysninger om modelltopp. Det beste modellionet (58) blir fratrukket støy-ion (85). Flere ioner (17stk, 58,134,91,59,119 osv) blir funnet til å ha >75 % likhet med modellion og blir brukt til å lage dette (bilder fra AMDIS).

Figur 15a-b viser et annet eksempel på modell-ion. Her er også modell-ion svart, m/z 150 (gul), m/z 155 (rød), TIC (hvit).



**Figur 15a:** Eksempel med kromatogram fra AMDIS viser at ion 155(rød) er ikke-spesifikk, ion 150(gul) er spesifikk for modell (svart) [16].



**Figur 15b.** Samme eksempel som figur 15a, forskjell er at ion 150(gul) er reskalert og er funnet å ha >75 % av skarphet fra modell-ion(sort) [16].

For å indentifisere ulike stoff blir hvert enkelt stoffspekter sammenliknet mot et referansebibliotek, og de spektra som ligner mest kommer på en "hit"-liste av bibliotekspekter. Dette på grunnlag av likhet mot target-spekter og en utregnet "match"-faktor. Både eliminering av forstyrrende bakgrunnstopper og flere andre modifikasjoner for utregning av match-faktor gjøres for å øke sikkerheten på treffene [16-18].

#### 1.6.4 DRS og fordelene ved biblioteksøk med DRS

DRS er et verktøy for automatisering av analysering, prossesering og rapportering av prøver analysert på GCMS. Det er et program som kombinerer resultater fra MSD ChemStation, AMDIS og NIST søkeprogram. DRS kan brukes både i full scan- og SIM-mode. MSD-DRS-

rapport kan kjøres fra instrumentet automatisk etter dataoppsamling eller reprocesseres ved senere dataanalyse.

I DRS vil MSD ChemStation først identifisere målioner ved å integrere ekstraherte ioner og sammenligne ioneratio (målion/kontrollion) til kjente ratioer i kalibreringsrekka. Denne informasjonen lagres og brukes senere i prosessen. DRS sender så disse datafiler til AMDIS som deconvolutterer spektrene. Disse deconvolutterte, ”rensede,” spektrene blir sammenliknet med fullt spekter mot et AMDIS-konfigurerte bibliotek. AMDIS er RT-uavhengig. Men RT kan settes inn som et filter i AMDIS som da krever at analyttens RT skal være innen et brukerspesifisert tidsvindu. De identifiserte spektra lagres i tabell for senere bruk og sendes også til NIST-bibliotek for konfirmering av AMDIS-funn. Resultater fra disse tre teknikkene blir sammenliknet og sortert, og en endelig rapport blir laget.

DRS med deconvolution-teknikken kan være et effektivt redskap for sikrere identifikasjon- og funn av stoffer ved lavere konsentrasjoner. Det gir større sikkerhet ved søk fordi algoritmer både innen støy, grenseverdier (threshold) og toppavlesninger er grundig gjennomarbeidet. Behandling av støy, korrigerings av basislinjedrift og ekstraksjon av ko-eluerende topper er del av deconvolution-prosessen. Dessuten er DRS tids- og kostbesparende på grunn av automatisk søk og enkel rapportering [14, 19].

## 2. Problemstilling

Ved analysering av prøver i komplisert matriks vil det på et GCMS full-scan-kromatogram være hundrevis av topper som skal søkes gjennom og sammenliknes mot referansebibliotek. Mange topper er kontaminert av ko-eluerende stoffer og ikke separert med det resultat at massespektrene blir en blanding av flere stoffer. Dette gir som resultat at spektrene blir vanskelig å sammenlikne mot referansebibliotek. Dessuten er analysetiden lang.

I dag benyttes en halv-automatisk scan-metode med en HP5-30m kolonne for kvalitativ analyse av ukjente prøver. Målsettingen med oppgaven er å utarbeide en metode som kan gi god massespektrometrisk oppløsning, halvere analysetiden, gi sikrere og flere treff på medikamenter/rusmidler mot biblioteksøk med RTL og gjøre databehandlingen av resultatene mer automatisert. Det ble foreslått å ta i bruk DRS-programvare, FT-DBL bibliotek med RTL og DB5-15m kolonne for å sammenlikne denne metoden mot den nåværende metode som ikke har DRS, avlesing mot bibliotek uten RTL og HP5-30m-kolonne.

Tre problemstillinger ønskes besvart i denne oppgaven:

4. Vil en metode med deconvolution-teknikk og FT-DBL-RTL på en 15 m DB5 kolonne (ny metode) gi flere funn sammenlignet med en metode uten deconvolution-teknikk på en 30 m HP5- kolonne (gammel metode)?
5. Vil antall funn ved bruk av de to forskjellige kolonnene påvirkes av hvorvidt deconvolution-teknikk benyttes eller ikke?
6. Vil ny metode gi en gevinst med tanke på ressursbruk i forhold til gammel metode?

## 3. Materialer, metoder, instrumenter.

### 3.1 Materialer, reagenser, utstyr og kolonner

Materialet til denne oppgaven er 167 rettsmedisinske blodprøver som er mottatt til analyse på Avdeling for klinisk farmakologi ved St. Olavs Hospital, Trondheim. De 70 første av disse prøvene, nummerert 1-70, er materiale som har vært analysert tidligere og har vært nedfrosset i ca.1 år. De ble tint, og det ble gjort et re-uttak. De resterende 97 prøvene, prøvenummer 71-167, var rettsmedisinske prøver som kom til avdelingen og rutinemessig ekstrahert ved sur-og basisk screen. Ferdig ekstrakt ble injisert på GCMS ved full scan-metoder.

Reagenser:

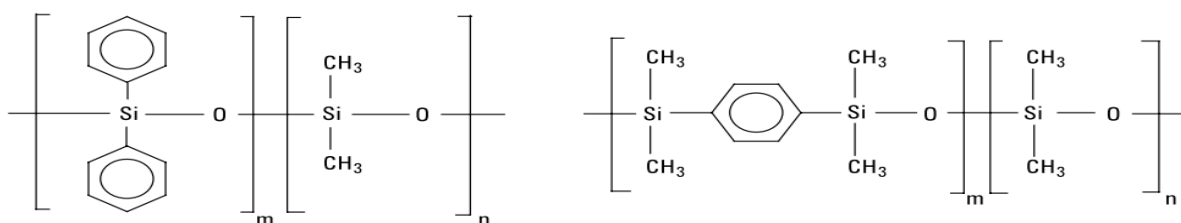
- Metanol HPLC-grad fra VWR-BDH-PROLABO, B-3001 Leuven, Belgia
- Diklormetan (DCM) fra VWR-BDH-PROLABO, B-3001 Leuven, Belgia
- Hexan fra VWR-BDH-PROLABO, B-3001 Leuven, Belgia
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> fra VWR-BDH-PROLABO, B-3001 Leuven, Belgia
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fra ROTH GmbH, Karlsruhe, Tyskland
- Isopropanol fra Arcus kjemi, Oslo

Praktisk utstyr til prøveopparbeidelse:

- Prøvevippe fra Heidolf Reax 2, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
- Sentrifuge fra Rotanta 46/Hettich Zentrifugen, Hettich AG, CH 8806-Bach, Sveits
- Varmeblokk fra Thermolyne, Dan Mezansky A/S, Oslo
- Rister fra JK MS2 Minishaker, IKA-Werke-GMBH, Staufen, Tyskland

I oppgaven brukes det to typer kapillærkolonner, metode "UTEN DRS" bruker HP5-30m og metode "MED DRS" bruker DB5-15m. Begge kolonner er produsert av J&W Scientific, Agilent (spesifisert i vedlegg 1, tabell 8).

Strukturforandringen som er gjort i DB5-5m-kolonnen er for å hindre dekomponering av siloxan til cyclosiloxan som sees som kolonneblødning. Silylaryl-typen av polymer gjør ”ryggraden” til kolonnen stivere ved at de er i siloxan-ryggraden og ikke som substituent som ved HP-30m-kolonnen. Strukturen på kolonnene vises i figur 16 [20].



HP5-30m: Struktur av difenyldimetylpolysiloxan, 5%-fenyl

DB5-15m: Struktur av poly(dimetylsiloxyl)poly(1,4-bis(dimetylsiloxyl)fenylen)siloxan 5%-fenyl

**Figur16.** Struktur av kolonnetyper som er brukt, HP5-30m (venstre) og DB5-15m [20].

## 3.2 Metoden

Metoden bestod av opparbeiding av blodprøver fra rettsmedisinske obduksjoner. Det ble utført både basisk og sur ekstraksjon av blodprøvene, og de ferdige ekstraktene ble injisert på to separate GCMS-instrumenter mot metodene MED DRS og UTEN DRS. Forskjellen på instrumentene var at de hadde ulike kolonner, DB5-15m og HP5-30m, som igjen medførte noen forskjellige parameter-innstillinger. Instrumentene inneholdt de samme programvarene. Analysedata på de to instrumentene kunne derfor i ettertid sammenlignes og behandles på forskjellig vis først og fremst for å finne innvirkningen av DRS på funn av stoff, dessuten innvirkningen av kolonnen på funn-resultatet.

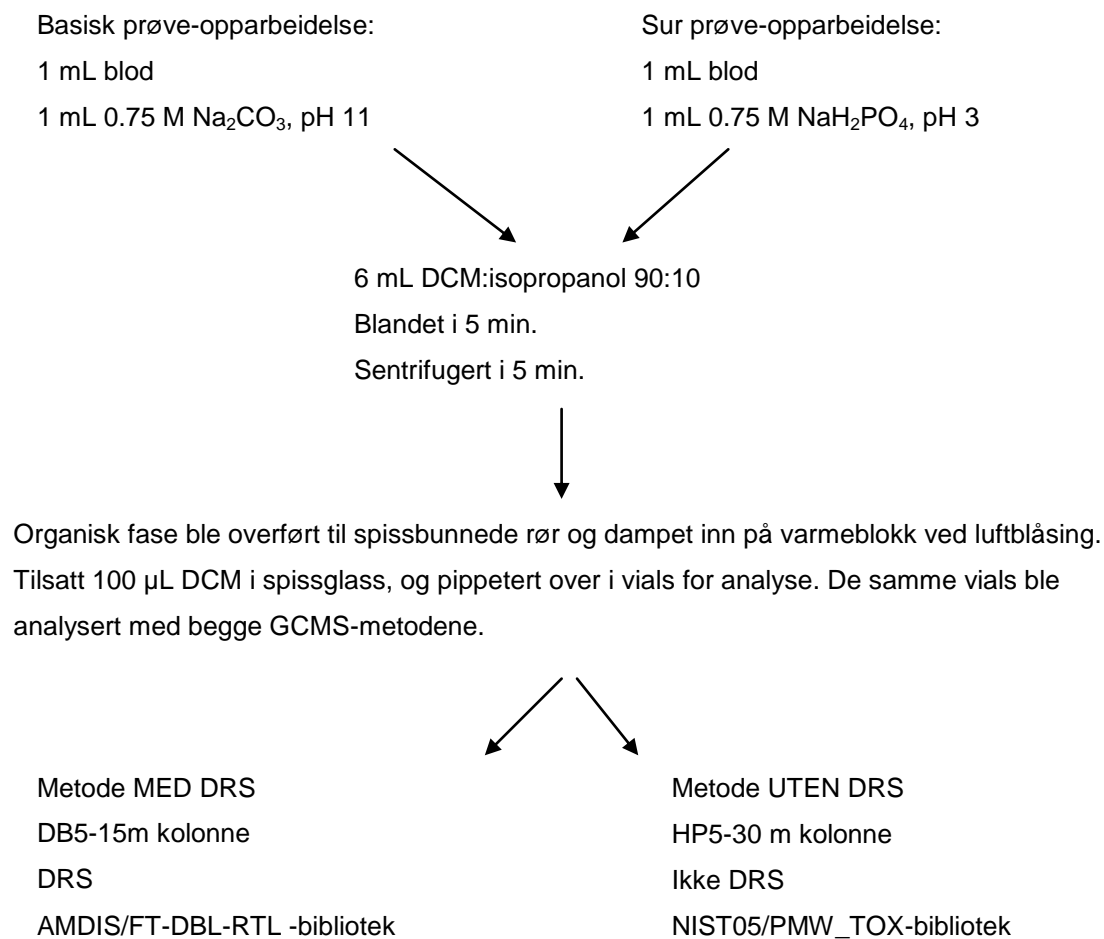


### 3.2.1 Metodeutvikling for opparbeiding/ekstrahering av prøver

Blodprøvene skulle analyseres mot full scan metode og kvalitativt, i første omgang for å finne hvilket medikament eller rusmidler prøvene innholdt, deretter ble det vurdert kvantitativ analyse. Prøvene som skulle ekstraheres var ofte både klumpete og tyktflytende, og en del av prøvene inneholdt lite materiale til analysen. Det ble derfor satt store krav til at ekstraksjonen skulle gi mest mulig utbytte, og at opprensning av matriksen ga minst mulig tap av stoffer. Ekstraktet som ble injisert skulle gi god kromatografi og et spekter som ga best mulig deteksjon. Ekstraksjonsmetoden måtte være generell og mest mulig avdekke hele området av medikamenter. Det var derfor viktig å vite hvor medikamentenes pKa- område var, og i hvilket logP-område løsemiddelet/ekstraksjonsmiddelet måtte ha for å få de beste betingelser for ekstraksjonen. De aller fleste medikamenter var i området pKa 3-10. For å få både de sure og basiske medikamentene over på ikke-ionisert form under ekstraksjonen, måtte det gjøres både en sur og en basisk ekstraksjon. I dag brukes pH 3 på den sure ekstraksjon, pH 11 på den basiske.

### 3.2.2 Beskrivelse av metode

1 mL blod-standarder og prøver ble ekstrahert både basisk og surt. Den basiske ekstraksjonen ble gjort med 1 mL 0.75 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 11 og den sure ekstraksjonen med 1 mL 0.75 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 3. Prøvene ble tilsatt 6 mL av en blanding av diklormetan og isopropanol i forholdet 90:10. Glassene ble blandet i 5 minutter og deretter sentrifugert i 5 minutter ved 3000 omdreininger. Den organiske fasen ble avpipetert over i spissglass og dampet inn ved luftblåsing ved 40 °C på varmeblokk. Spissglassene ble deretter tilsatt 100  $\mu\text{L}$  DCM og blandet i rister i 30 sekunder, før 100  $\mu\text{L}$  ble pipetert over i vials med inserts og topp (små glass tilpasset automatisk injeksjon) og injisert på GCMS. Se flytskjema figur 17.



**Figur 17.** Ekstraksjonsmetode-flytskjema viser prøveopparbeidelse med sur og basisk væske-væske ekstraksjon, inndampning av den organiske fasen som inneholder analytter. Denne blir løst i DCM og overføring til vials. Vials med de ukjente prøver blir injisert på GCMS-instrumentene.

### 3.3 Instrumentene

Følgende instrumentmoduler og programvare ble benyttet:

#### **Instrument:**

GC 6890/ MSD 5973

HP-LCMSD, versjon G2735B

HP 1100-serie av pumpe, degasser, injeksjonssystem.

Agilent Technologies QqQ 6410 trippelquadropol, versjon G6410A,

Agilent Technologies 1200-serie av pumpe, degasser, injeksjonssystem

Agilent Technologies, 395 Page Mill Rd, Palo Alto, California, USA

Innstillinger av instrumentene er gitt i vedlegg 1.

#### **Programvare:**

MSD chemstation: D.02.00 SP1, aug. 2005, G1701DA.

Deconvolution Reporting Software: A.02.01, des. 2005, G1716AA.

Forensic Toxicology RTL Database/LibraryG1674 AA, versjon A.01.00, 2008.

NIST05, versjon D.05.00, G1033A, juni 2005.

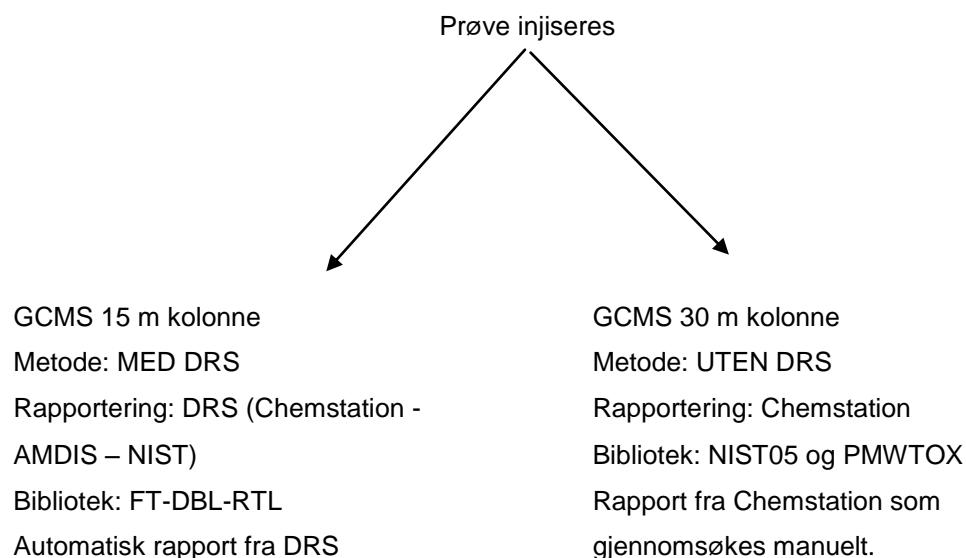
PMW\_TOX-bibliotek: Pflieger-Mauer, Wiley.

Instrumentene var Agilent GC 6890 med ovner på 240V og MS5975 med EPC split/splitless-injektor og Edwards diffusjonspumpe. Metodene var full scan metoder i masseområdet m/z 40-570 med helium som bæregass. Det ble lagt vekt på å gjøre forholdene ved instrumentene så like som mulig med optimaliserte forhold på begge instrumenter, som nye kolonner, ren ionekilde, vasket injektor og nye injeksjonssprøyter.

En HP5-30m-kolonne med analysetid på 24 minutter ble benyttet i metoden UTEN DRS. Indre diameter og filmtykkelse på kolonnen var henholdsvis 0.25 mm og 0.25 µm. Det ble brukt splitless-injeksjon med 1 µL injeksjonsvolum og konstant flow i inlet. Inlet-temperatur var 250 °C, initiell ovntemperaturer 50 °C med økning på 20 °C pr minutt opp til 300 °C. Det

nominelle trykket var 7.64 psi. Solvent delay (tid før masser begynner å registreres i kvadropol) var 3 minutter. Ionekilde- og kvadropol-temperatur var henholdsvis 230 °C og 150 °C. Det ble brukt Chemstation programvare med biblioteksøk mot NIST og PMW-TOX og Chemstation-rapportering som manuelt ble gjennomført etterpå.

En DB5-15m kolonne med analysetid på 14.25 minutter ble benyttet i metoden MED DRS. Diameter og filmtykkelse på kolonnene var 0.25 mm og 0.25 µm. Det ble brukt splitless-injeksjon med 1 µL injeksjonsvolum og konstant trykk i GC-inlet. Inlet-temperatur var 280 °C, initiell ovnstemperatur var 100 °C med økning på 20 °C pr.minutt opp til 325 °C. Det nominelle trykket var 4.7 psi og solvent delay var 1.4 minutter. Ionekilde- og kvadropol-temperaturer var 300 °C og 150 °C. Det ble i tillegg til Chemstation brukt DRS-programvare mot FT-RTL-DBL-biblioteksøk. Figur 18 viser flytskjema for analysering på begge instrumenter.



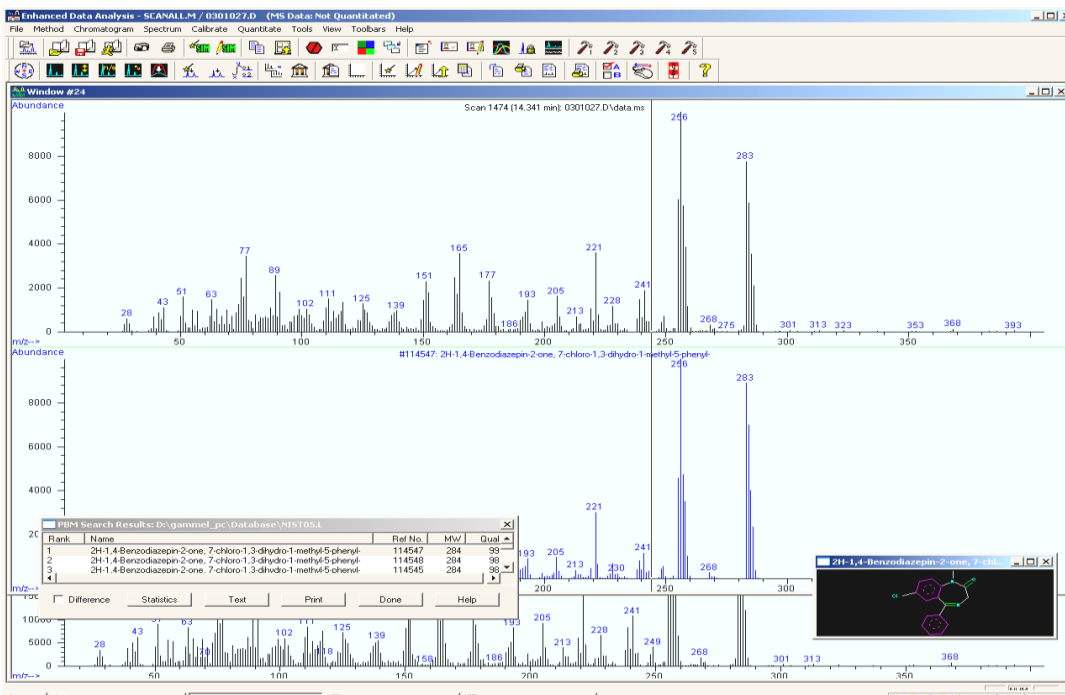
**Figur 18.** Flytskjema for analysering og rapportering for begge anvendte metoder.

### 3.3.1 Innstilling og avlesning på instrument med metode UTEN DRS

Det ble søkt mot to bibliotek, NIST05 og PMW\_TOX i metoden UTEN DRS. Alle topper som ble integrert, ble sammenliknet mot Chemstation-bibliotekene. Integreringsparameteren "threshold" (grenseverdi) ble satt lavt for å få flest mulig topper integrert. Små topper kan inneholde stoffer av betydning. Dessuten ble det integrert flere topper som var delvis overliggende og hadde dårlig separasjon når threshold var lav. Default-verdier ble brukt på søkeparameter-innstillinger (vedlegg 2, figur31).

Spektrene ble sammenliknet mot referansebibliotekene ved Problem Based Matching (PBM)-søk, og treffene kom ut på en rapport (eksempel på rapport i vedlegg 3) som ble gjennomført manuelt. Bibliotektreffene ble vurdert med henblikk på treffprosent og stofftype. Denne vurderingen ble gjort ved begge bibliotek, både PMW\_TOX og NIST05. Fordi prøvene inneholdt matrix fra blod, ble det mange bibliotektreff med endogene stoff i rapporten.

Treff som var relevant for prøven ble sjekket nærmere både med hensyn til ioneratio, topphøyde, RT og relevans for saken. Endogene og eksogene topper gjorde at antallet integrerte topper kunne bli flere hundre og være forstyrrende for avlesningen av analytter. Ved treff som måtte sjekkes nærmere ble bakgrunnsstøy forsøkt fjernet for å bedre spektertreff. Dette er vist i vedlegg 4. Spekteret kom fram, og ioner og fragmentering måtte vurderes (figur 19).



**Figur 19.** Manuelt PBM-søk i Chemstation. Spekteret blir sammenlignet mot referansebibliotek, og forslag til treff kommer fram i det lille bildet til venstre. Strukturen på de foreslåtte stoff-treff vises i lite bilde til høyre.

Spektra ble skrevet ut på stoffer som kunne være aktuelle og ha betydning for saken. Etterat automatisk søk var gjennomgått ble det i tillegg søkt manuelt ved å klikke i hver topp. Dette ble gjort å finne eventuelle stoffer med spektra som var gjemt i TIC-topper med dårlig separasjon, spektra som kanskje ikke var i bibliotek eller av annen grunn ikke kom med i rapporten. Eventuelle nye spektra ble vurdert basert på fragmentering. MW og RT for å identifisere stoffet. Dersom spektra hadde usikre treff, eller det var ”mistenkelige” spektra som måtte undersøkes nærmere, ble det i tillegg kjørt scan på LCMS for MW-søk. Usikre treff ble bekreftet negativ eventuelt positiv på LCMS eller LCMSMS på egne SIM-metoder.

### 3.3.2 Innstilling og avlesning på instrument med metode MED DRS

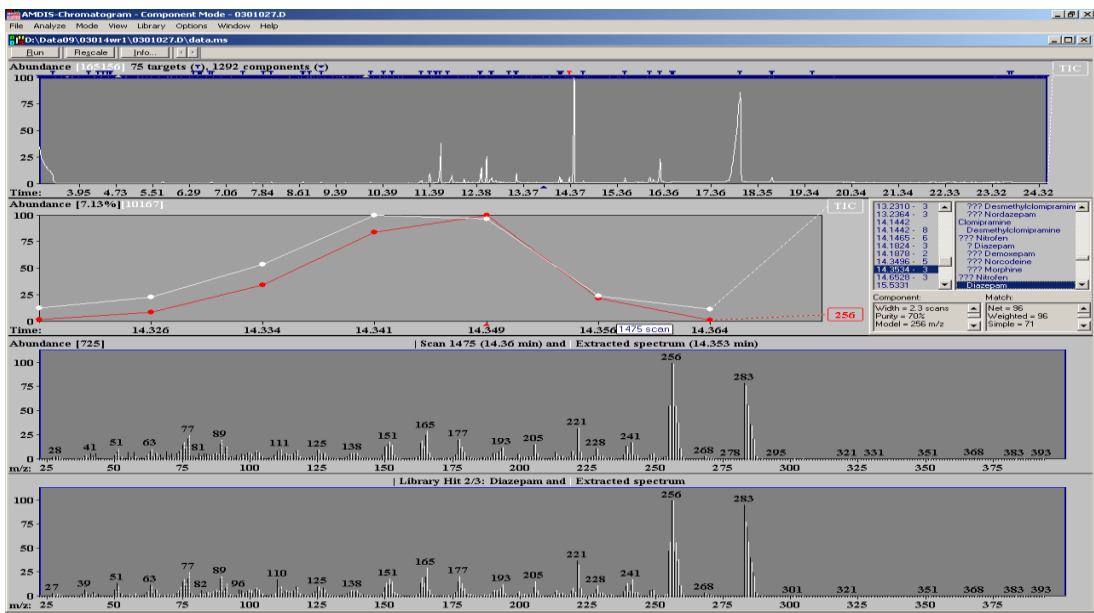
Ved metode ”MED DRS” ble biblioteksøket automatisk gjort i flere trinn. Først ble datafila sendt til MSD Chemstation, deretter ble disse resultatene sendt til AMDIS for

deconvolutering og videresendes til NIST-biblioteket. Til slutt ble resultatene samlet og rapportert automatisk.

For at ønsket metode og bibliotek skal bli brukt i AMDIS og DRS, må det konfigureres med henblikk mot dette (vedlegg 2, figur 32). I AMDIS ble det satt forskjellige parameterinnstillinger. "Minimum match factor", minste %-treff mot referansebibliotek som skulle rapporteres, ble satt til 50%. RTL ble brukt som et filter for å sile ut spektre som ikke hadde RT innenfor tidsintervallet som ble satt. Den automatiske avlesningen ble kontrollert mot RT i FT-biblioteket. Variasjonene ble satt til +/- 20 sekunder i stedet for "default"-verdi som var +/-10 sekunder. Venlafaxin ble brukt som låsestoff fordi det kom midt i RT-området og ga en klar og tydelig topp. Flere parameter-innstillinger kunne varieres, men det ble valgt å bruke de fleste "default"-innstillinger fordi disse var utprøvd og optimalisert på forhånd.

Rekkefølgen av det som skjedde i DRS:

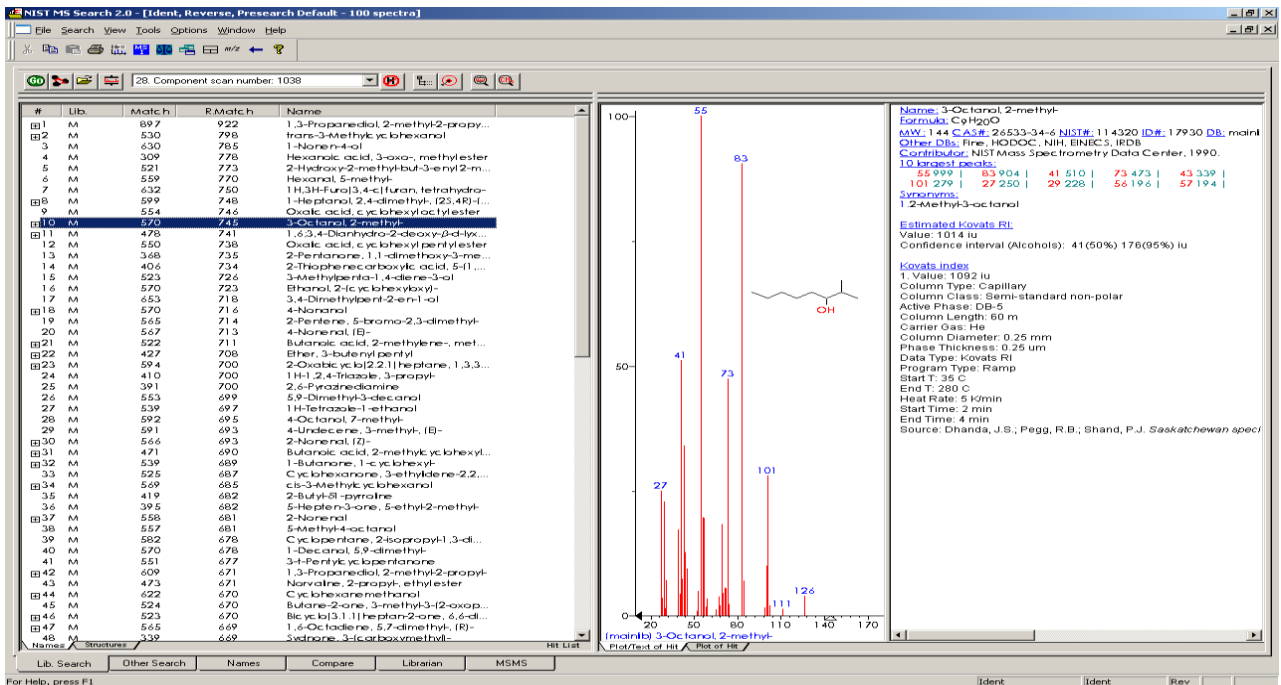
- 1) MSD ChemStation identifiserte mål-ioner ved å integrere ekstraherte ioner og sammenliknet ione- ratioer med kjente ratioer i kalibreringen for alle 725 stoffer. Scan analysen var kvalitativ, men det kunne legges inn en omtrentlig faktor til kalibrering ved å bruke for eksempel låse-stoffet venlafaxin i en konsentrasjon på 5 µg/mL som kalibrator. Denne verdien ble brukt som en responsfaktor på alle mengde-tall i rapporten. Konsentrasjonene var en omtrentlig indikator på mengden av stoffet i screeningen. All informasjon fra ChemStation ble lagret og brukt senere i prosessen.
- 2) AMDIS deconvoluterte ChemStation data-fila. De "ekstraherte" eller rensede spektrene ble sammenliknet mot det AMDIS-konfigurerte biblioteket FT-DBL-RTL. Denne prosessen er automatisk i et DRS-oppsett, men kan kjøres manuelt ved oppsett uten DRS (figur 20). Oppløsning og sensitivitet kunne økes og derved få flere topper, men ikke nødvendigvis mer korrekt svar. Dessuten ville det ta lengre tid å analysere datafilene dersom både oppløsning og sensitiviteten er høy. Det ble derfor en avveining på hva en ønsket og ofte gir "default" verdier akseptable resultater.



**Figur 20.** ”Compound”-vindu i AMDIS som viste TIC-vindu, vindu for utvalgt topp, deconvolutert spekter for et stoff og bibliotektreffet nederst. Til høyre et vindu som viser RT og treff i bibliotek på deconvoluterte spektrere. (Skjermbilde fra AMDIS, ChemStation).

NIST søkte alle spektra som nå var deconvolutert mot NIST-biblioteket. Dette var også et fullt spektersøk, men denne gang mot et annet bibliotek enn det som ble brukt i AMDIS. Resultatet av dette søket kom i kolonne 7 og 8 i rapporten figur 22. I kolonnen ”NIST, Reverse Match” ble stoff-spektrere funnet i AMDIS eventuelt bekreftet mot NIST-biblioteket (figur 21). ”Hit Num.”-kolonnen var treffet i NIST’s-resultatliste.





**Figure 21.** Figur viser eksempel på en rapport fra NIST. (Skjerm bilde fra ChemStation).

Resultater fra disse tre teknikkene ble sammenliknet og sortert, og en endelig rapport ble laget. Denne rapporten er vist i figur 22. Den ble skrevet ut fra ”Quant-DRS single file”i ”Enhanced Data Analysis”. Dataanalysetiden for hver prøve som ble kjørt gjennom DRS-systemet var ca. 3 minutter.

MSD Deconvolution Report  
Sample Name: ktr\_bas  
Data File: I:\GCMS3\Data 09\03013wr1\0301103.D\0301103.D  
Date/Time: 04:38 PM Tuesday, Apr 7 2009

The NIST library was searched for the components that were found in the AMDIS target library.

R.T.	Cas #	Compound Name	Agilent ChemStation Amount (~ng)	AMDIS Match	R.T. Diff sec.	NIST Reverse Match	Hit Num.
3.4223	98920	Nicotinamide	87.76	99	6.2	93	1
4.3799	999401024	Carisoprodol artifact		81	2.2		
4.3799	0000	2-Oxo-1-oxa-spiro[4.5]decane-4-carboxylic acid phenethyl-amide				57	1
4.5356	102767282	Levetiracetam		50	6.0		
4.5356	75322962	N-(5-Pyrrolidinopent-3-ynyl)-succinimide, N'-oxide				63	1
5.341	486566	Cotinine	4.1	83	3.2	82	1
5.948	57534	Meprobamate	266.23	97	5.6	93	1
6.176	58082	Caffeine	89.78	97	5.2	93	1
6.324	83670	Theobromine	436.11	92	7.6	86	1
6.4057	78444	Carisoprodol		95	4.3	88	1
6.609	115388	Mephobarbital	4.29	94	5.2	82	1
7.0538	50066	Phenobarbital		81	10.1		
7.0538	25779855	Cyclopentaneundecanoic acid, methyl ester				77	1
7.409	999278023	Eucatropine Isomer 1 TMS	3.11				
7.410	999518024	Eucatropine Isomer 2 TMS	3.07				
7.471	93413695	Venlafaxine	1.49				
7.472	999173023	Venlafaxine TMS	0.25				
8.130	50486	Amitriptyline	297.69	90	5.5	73	5
8.144	82939	Chlorcyclizine	4.08				
8.322	1225565	Desmethyldoxepin (trans)	326.09				
8.3487	72695	Nortriptyline		71	13.2	74	1
8.689	51343	Scopolamine	1.67				
9.083	113531	Dothiepin	6				
9.095	76573	Codeine	357.98	76	6.9	94	1
9.1586	303491	Clomipramine		90	6.5	95	1
9.1586	303480	Desmethylclomipramine		66	-0.7	84	2
9.304	439145	Diazepam	292.48	92	7.3	97	1
9.441	999524026	Norchlordiazepoxide Breakdown	17.05				
9.442	78755814	Flumazenil	2.28				
9.6830	1088115	Nordiazepam		86	10.8	91	1
9.9629	999151029	Nortriptyline AC		85	-4.5		
9.9629	74810803	Carbamic acid, [3-(10,11-				89	1

Figur 22. Rapport fra Quant-DRS single file (Bilde fra ChemStation). Oppsummering av rapport :

Kolonne 1, 2 og 3 er henholdsvis RT, CAS-nummer og stoffnavn.

Kolonne 4: Dersom RT og ioneratio i Chemstation stemmer med det ukjente spekters ioneratio i kalibreringstabell, vil det i rapporten komme ut en verdi i kolonne 4. Denne verdien er en antatt konsentrasjon funnet ved faktor-multiplisering etter at et bestemt stoff ved en spesiell konsentrasjon er injisert. Dersom det ikke blir noe tall i denne kolonnen, betyr det at kravene ikke er innfridd. Men alle ekstraherte ionespektra-filer går likevel videre til AMDIS for deconvolution.

Kolonne 5: Deconvoluterte spectra blir sammenliknet mot det AMDIS-konfigurerte-biblioteket og et evt %-treff > 50 % kommer inn i kolonne 5.

Kolonne 6: Her kommer retensjonstidsforskjell på stoff-funn i prøve og kalibreringstabell. Dersom denne verdien blir for høy/lav, kan en mistenke at treffet ikke er rett.

Kolonne 7: Her er resultatet av et reverst NIST-søk. Det betyr at funn som er gjort i AMDIS sendes til NIST-biblioteket for bekreftelse.

Kolonne 8: Dette viser "Hit"-nr i NIST-søket, jo lavere tall, dess sikrere treff.

## 4. Resultater

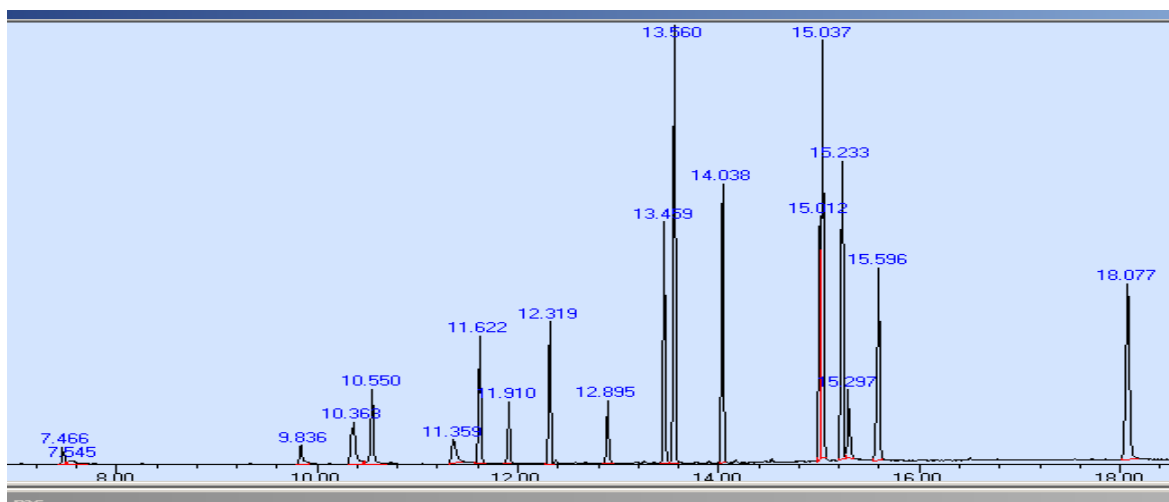
### 4.1 Deteksjonsgrenser og recovery

For å sjekke metodene mot hverandre angående deteksjonsgrenser ble det utført både en sur og en basisk ekstraksjon i en fortynningsrekke av en blanding med 18 forskjellige stoffer. Stoffene ble laget ved fortynninger fra ”Stock”-løsninger (start-løsninger). RT på stoffene var spredt i det aktuelle området, samtidig var det variasjon av pKa verdier fra 3 til 14 og logP-verdier fra ca. -0.7 til +5. Tabell 1 viser disse verdiene. Strukturer av stoffer som er med i undersøkelsen er vist i vedlegg 5.

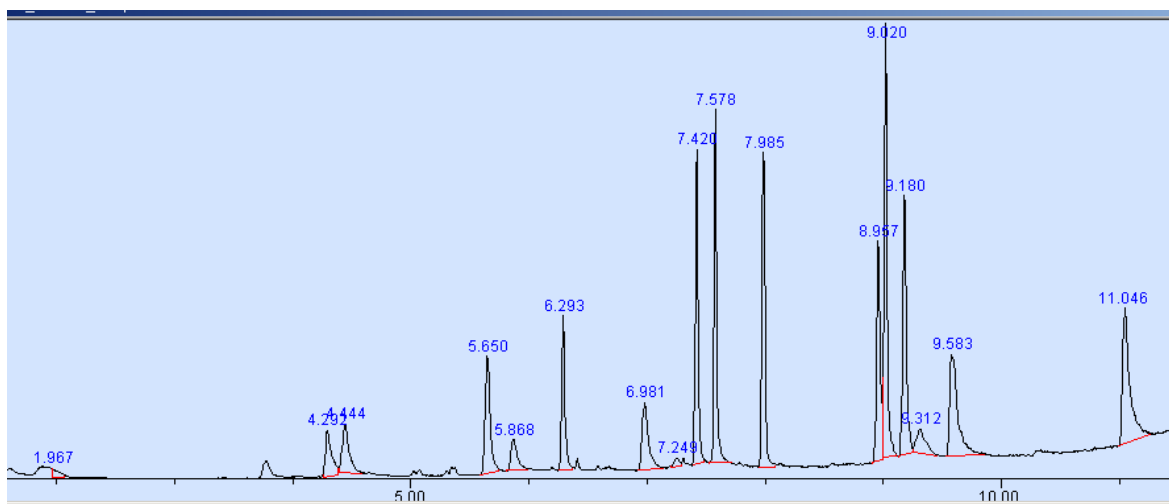
**Tabell 1.** Oversikt over stoffer som er med i deteksjons/recovery-forsøket. Blanke felt er ukjente verdier. Kokepunkt (bp) er ved 760mmHg (\*Bp for karisoprodol var ved 2 mmHg, fenobarbital ved 12mm Hg og kodein ved 22 mmHg, morfin ukjent mmHg) [21, 22].

Stoff	RT HP5-30m	RT DB5-15m	Bp (°C)	MW (g/mol)	pKa	logP	Fragmenter/M <sup>+</sup> (m/z)
Amfetamin	7.54	1.91	202	135	9.9	1.8	44-91-65
Salicylsyresyre	7.97	2.12	321	138	3	1.4	120-152-92
MDMA	10.36	4.29	283	193	8.	1.9	58-135-77
Levetiracetam	10.55	4.44	396	170	-0.6	0.67	126-69-58
Paracetamol	11.36	5.47	387	151	9.5	0.51	109-151-80-108
Pentobarbital	11.62	5.65		226	8.1	2.07	156-141-157-69
Meprobamat	11.91	5.87	434	218	14 ?	0.7	83-71-62-84
Karisoprodol	12.32	6.29	170*	280	4.2	2.1	158-58-62-104
Fenobarbital	12.89	6.98	140*	232	7.4	1.53	204-117-115-103
Metoprolol	13.18	7.24		267	9.68	1.88	72-223-107
Venlafaxin	13.56	7.42	397	277	9.4	2.69	58-134-179-91
Amitriptylin	14.04	7.98	398	277	9.42	4.92	58-202-203
Kodein	15.01	8.96	250*	299	8.28	1.14	299-229-162-115
Klomipramin	15.03	9.02	434	314	9.39	4.5	58-269-268-85
Diazepam	15.23	9.18	497	284	3.3	2.9	256-257-258-255
Morfin	15.30	9.30	254	285	7.9	0.89	285-215-162
Desmetyldiazepam	15.59	9.57	453	270	3.5	2.8	242-243-241-244
Klozapin	18.08	11.04	477	326	3.7 og 7.6	2.71	243-256-258-227

Konsentrasjonene av fortytningene var 1-10-50-100-250-500-750-1000-5000-10000-50000 nM og laget fra stockløsninger på 1- og 10 mM. Fortytningene ble ekstrahert surt og basisk og ble deretter analysert på begge metodene UTEN DRS og MED DRS. I tillegg ble det kjørt en fortytningsrekke av direkte injeksjoner av den samme blandingen. Disse konsentrasjonene måtte være 10x sterkere enn de ekstraherte fordi det ble tatt hensyn til oppkonsentrering (1 mL oppkonsentreres til 100 µL) under opparbeiding. Disse resultatene ble brukt til recoveryundersøkelse. Kromatogram fra en standard som inneholder alle stoffer analysert på begge typer kolonner sees i figur 23.



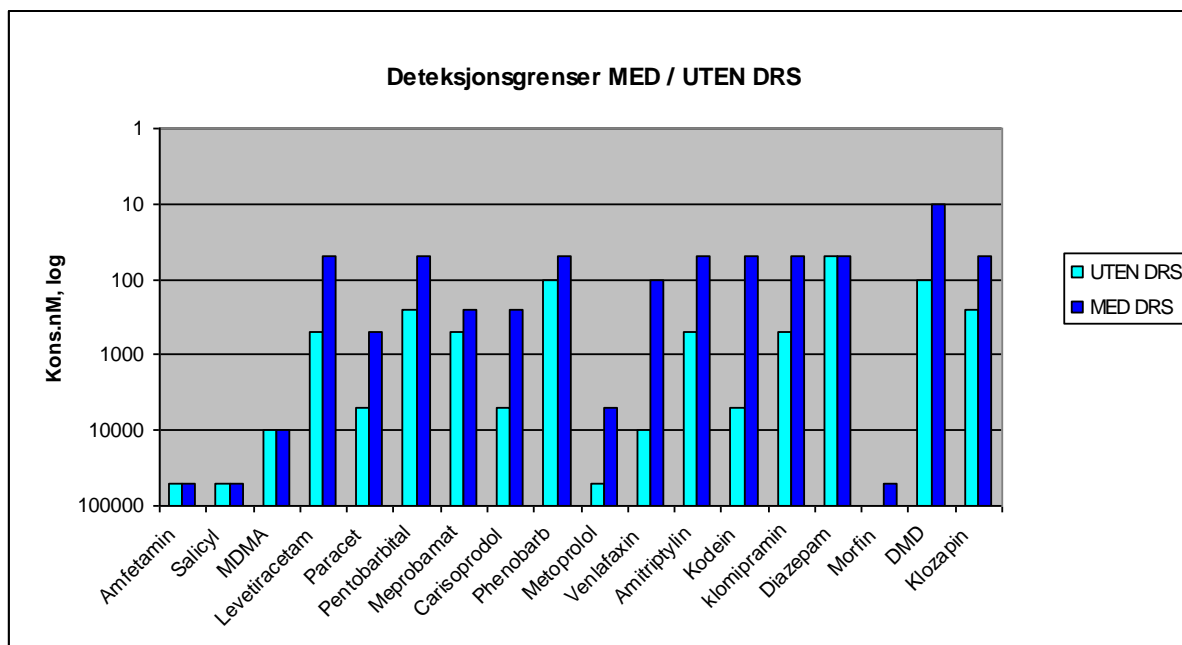
HP5-30m-kolonne



DB5-15m-kolonne

**Figur 23.** Figur viser kromatogrammer fra både DB5-15m- og HP5-30m-kolonner ved injeksjon av en standard som inneholder alle stoffer som er i tabell 1.

Histogram i figur 24 og vedlegg 6 og 7 viser resultat fra deteksjon-og recoveryundersøkelsen.



**Figur 24.** Histogram viser deteksjonsgrenser for ekstraherte prøver MED-og UTEN DRS. X-aksen viser type stoff som er med i undersøkelsen, y-aksen viser logaritmisk konsentrasjonene i nM. I vedlegg 6 er alle data fra undersøkelsen.

## 4.2 Ekstrahering av prøver

Materialet til dette eksperimentet var fra 167 rettsmedisinske blodprøver. Disse ble merket med nummer 1-167. Prøvene 1-70 var positive prøver som tidligere var kjørt i rutine-analyser, prøvene 71-167 var prøver som var kjørt rutinemessig og analysert for første gang. Prøvene 1-70 hadde vært frosset i -20 °C. Det ble gjort reuttak av disse etter at prøver var tint og blandet godt for å få en homogen masse. Alle de 70 prøvene ble opparbeidet samtidig av samme person. Ferdig opparbeidede prøver ble delt slik at prøvene 1-46 ble analysert på metoden MED DRS som hadde den korteste analyssetiden. De resterende prøvene, 47-70, ble analysert på metoden UTEN DRS. Deretter ble de byttet om, og prøvene ble analysert på det andre instrumentet. Tabell 2 viser resultatene fra denne undersøkelsen, tabell 3 viser en oppsummering av antall funn, tiden som er brukt både pr. prøve og totalt på 70 prøver. Figur

25 viser et histogram over funnene. Nye funn på prøver 1-70 ble bekreftet ved SIM-metoder på LCMS (vedlegg 8).

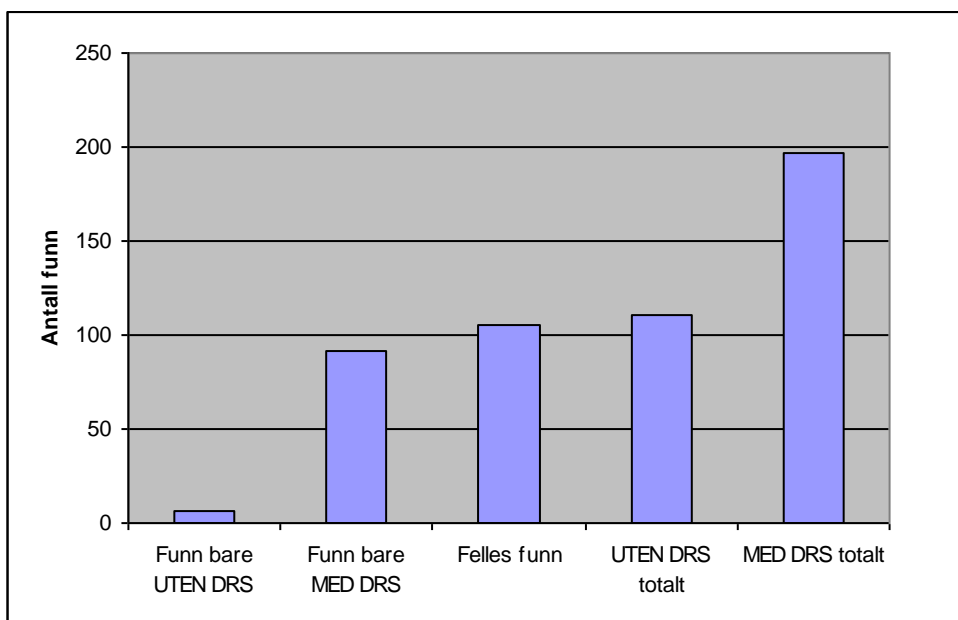
**Tabell 2.** Resultat fra prøver 1-70. Disse prøver er reuttak. Kolonnene viser fra venstre prøvens nummer, resultat fra funn med metoden MED DRS og resultat av funn med metoden UTEN DRS. Stoffnavn i *kursiv* er unike funn som bare ble funnet i en av metodene.

Prøvenr.	Resultat fra metode MED DRS	Resultat fra metode UTEN DRS
1	Mirtazapine	Mirtazapin
2	Lidokain	Lidokain
3	Negativ	Negativ
4	Paracetamol, mirtazapin, <i>kodein, diazepam, desmetyldiazepam</i>	Paracetamol, mirtazapin
5	Metadone, venlafaxin, <i>norvenlafaxin, diazepam, desmetyldiazepam, levomepromazin</i> , paracetamol	Metadon, venlafaxin, paracetamol
6	Negativ	Negativ
7	<i>Quinine</i>	Negativ
8	Negativ	Negativ
9	Karbamazepin, <i>klorprotixen</i>	Karbamazepin
10	Paracetamol	Paracetamol
11	Paracetamol, <i>oxycodon</i> , fluconazole	Paracetamol, fluconazole
12	<i>Klorfeniramin, diazepam, desmetyldiazepam</i>	Negativ
13	Valproat, <i>warfarin</i>	Valproat
14	<i>Levetiracetam</i> , paracetamol	Paracetamol
15	Kodein, diazepam, <i>desmetyldiazepam</i> , paracetamol, venlafaxin, <i>norvenlafaxin</i> , alimemazin, klorfeniramin, tramadol, DM-tramadol, naproxen, <i>citalopram</i> ,	Kodein, diazepam, paracetamol, venlafaxin, alimemazin, klorfeniramin, tramadol, DM-tramadol, naproxen
16	Alimemazin	Alimemazin
17	Paracetamol, <i>venlafaxin</i>	Paracetamol
18	Mirtazapin, <i>lidokain</i>	Mirtazapin
19	<i>Klorfenesin</i> , oxycodon	Oxycodon
20	<i>Metoklopramid</i>	Negativ
21	Fluoxetin, <i>norfluoxetin, quetiapin, levomepromazin</i>	Fluoxetin
22	Alimemazin	Alimemazin
23	Paracetamol, <i>diazepam</i> , desmetyldiazepam, <i>klorprotixen, ibuprofen, klorcyclizin, citalopram</i>	Paracetamol, desmetyldiazepam
24	Levomepromazin, <i>venlafaxin</i>	Levomepromazin
25	Paracetamol, diazepam, <i>desmetyldiazepam, kodein</i>	Paracetamol, diazepam
26	Tramadol	Tramadol
27	<i>Paracetamol</i>	Negativ
28	Mirtazapin	Mirtazapin
29	<i>Pentobarbital</i> , tiopental,	Tiopental
30	<i>Diazepam</i> , desmetyldiazepam, <i>alprazolam</i>	desmetyldiazepam
31	Metronidazole, diazepam, <i>desmetyldiazepam</i>	Metronidazol, diazepam,
32	Ketamin	Ketamin
33	Trimipramin	Trimipramin
34	Karbamazepin, <i>metoklopramid</i>	Karbamazepin
35	<i>Trimipramin</i>	Negativ
36	Karbamazepin, <i>oxcarbamazepin</i>	Karbamazepin
37	Negativ	Negativ
38	Paracetamol	Paracetamol
39	Citalopram	Citalopram
40	Negativ	Negativ
41	<i>Warfarin, desmetyldiazepam</i>	Negativ

Prøvenr.	Resultat fra metode "MED DRS"	Resultat fra metode "UTEN DRS"
42	Paracetamol, <i>venlafaxin</i> , norvenlafaxin, mirtazapin, kodein, <i>desmetyldiazepam</i> , <i>diazepam</i> , zopiklone	Paracetamol, norvenlafaxin, mirtazapin, kodein, zopiklone
43	Trimetazidine	Trimetazidine
44	Paracetamol, <i>pentobarbital</i> , <i>tiopental</i> , ketamin, <i>norketamin</i> , <i>sulfodiazine</i> , midazolam, <i>laudanisin</i>	Paracetamol, ketamin, midazolam
45	Ketamin, <i>norketamin</i> , <i>flecainid</i>	Ketamin
46	Mirtazapin, <i>oxazepam</i>	Mirtazapin
47	Paracetamol, kodein	Paracetamol, kodein
48	Ketamine, <i>norketamin</i>	Ketamin
49	Paracetamol, metadon, <i>metadon-metabolitt</i> , kodein, <i>phencyclidin artifact</i>	Paracetamol, metadon, kodein
50	Paracetamol, karisoprodol, meprobamat, mianserin, DMmianserin, <i>norpropoxyfen</i> , <i>diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i> , levomepromazin, <i>olanzapin</i> , <i>temazepam</i> , <i>zolpidem</i>	Paracetamol, karisoprodol, meprobamat, <i>metoprolol</i> , mianserin, DMmianserin, levomepromazin
51	<i>Venlafaxin</i>	Negativ
52	<i>Diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i>	<i>Paracetamol</i>
53	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, amitriptylin, kodein, <i>klomipramin</i> , diazepam, desmetyldiazepam, <i>klozapin</i>	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, amitriptylin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam
54	Venlafaxin, norvenlafaxin, <i>diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i>	Venlafaxin, norvenlafaxin, <i>paracetamol</i> , <i>ibuprofen</i>
55	Paracetamol, mianserin, <i>zolpidem</i>	Paracetamol, mianserin
56	<i>Diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i>	Negativ
57	Paracetamol	Paracetamol
58	<i>Ibuprofen</i> , tamoxifen, paracetamol	Tamoxifen, paracetamol
59	Ketamin, <i>norketamin</i> , lidokain, <i>laudanisin</i> , <i>norvenlafaxin</i>	Ketamin, lidokain
60	Paracetamol, <i>pentobarb</i> , <i>diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i> , <i>midazolam</i>	Paracetamol
61	Diazepam	Diazepam
62	Alimemazin, citalopram, alprazolam, <i>zopiklone</i> , paracetamol	Alimemazin, citalopram, alprazolam, paracetamol
63	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, kodein, ibuprofen	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, kodein, ibuprofen
64	<i>Paracetamol</i> , <i>ibuprofen</i>	Negativ
65	Paracetamol, lidokain, mirtazapin, bupivacain	Paracetamol, lidokain, mirtazapin, bupivacain
66	Gabapentin	Gabapentin
67	Valproat, <i>THC</i> , levomepromazin	Valproat, <i>paracetamol</i> , levomepromazin
68	<i>Alimemazin</i> , <i>zopiklone</i>	<i>Paracetamol</i>
69	<i>Kodein</i> , paracetamol	Paracetamol
70	Lidokain, <i>bupivacain</i> , <i>diazepam</i> , <i>desmetyldiazepam</i> , paracetamol, <i>pentobarbital</i> , <i>tiopental</i>	Lidokain, paracetamol

**Tabell 3.** Tabellen viser en oppsummering av antall stoff-funn i prøver 1-70 analysert på metodene MED DRS (197) og UTEN DRS (111). Analysetid på instrumentet var 14-og 24 minutter pr. prøve, rapporteringstid var henholdsvis ca. 3-og 15 minutter, og den totale analysetid var ca. 20- og 46 timer.

	<b>MED DRS</b>	<b>UTEN DRS</b>
Antall treff, positive funn	197 stoffer	111 stoffer
Analysetid/instrument pr prøve	14 minutter	24 minutter
Avlesning/rapport pr.prøve	Ca. 3 minutter.	Ca. 15 minutter.
Total analysetid for 70 prøver	Ca. 20 timer	Ca. 46 timer



**Figur 25.** Histogrammet viser antall funn som ble gjort i reuttak av prøve 1-70 (n=70) for metodene MED DRS (197) og UTEN DRS (111), funn som ble gjort på begge metoder (105) og unike funn som kun ble gjort på MED DRS (92) og UTEN DRS (6).

Prøvene 71-164 ble opparbeidet av forskjellige personer etter hvert som de kom til laboratoriet. Resultater av alle stoff-funn og beregnet analysetid fra prøver 71-167 er vist i tabell 4- og 5. Et histogram over prøver fra 71-167 er vist i figur 26.



**Tabell 4.** Resultat av prøver nr. 70-167. Dette er prøver som ble analysert for første gang. Kolonner viser fra venstre prøvenummer, resultater fra metode MED DRS og resultater fra metode UTEN DRS. Stoffnavn i *kursiv* er forskjellige funn mellom de to metodene.

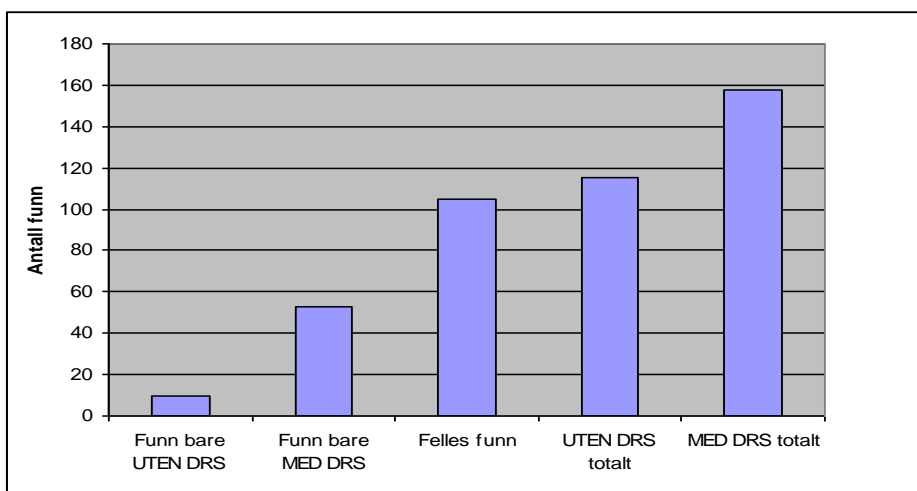
Prøvenr.	Resultat fra metode "MED DRS"	Resultat fra metode "UTEN DRS"
71	Naproxen, metadone, diazepam, desmetyldiazepam, ibuprofen	Naproxen, metadone, diazepam, desmetyldiazepam, ibuprofen
72	Karbamazepin, morfin, 6-MAM, kodein, paracetamol, <i>desmetyldiazepam, levomepromazin</i>	Karbamazepin, morfin, kodein, paracetamol
73	<i>Pentobarbital, thiopental, klorprotixen, trimipramin</i>	Negativ
74	Negativ	Negativ
75	Negativ	Negativ
76	Negativ	Negativ
77	<i>Pentobarbital</i>	Negativ
78	Paracetamol	Paracetamol
79	Paracetamol	Paracetamol
80	Negativ	Negativ
81	Diazepam, desmetyldiazepam	Diazepam, desmetyldiazepam
82	<i>Diazepam, donepezil</i>	Negativ
83	Negativ	Negativ
84	Negativ	Negativ
85	Negativ	Negativ
86	Metronidazol, midazolam, paracetamol, diazepam, propofol, <i>pentobarbital</i> .	Metronidazol, midazolam, paracetamol, diazepam, propofol
87	Negativ	Negativ
88	<i>Warfarin</i> , metronidazol, paracetamol, midazolam, fentanyl, laudanosine	Metronidazol, paracetamol, midazolam, fentanyl, laudanosine
89	Metronidazol, pentobarb, thiopental, paracetamol, midazolam, <i>morfin</i> , laudanosin	Metronidazol, pentobarb, thiopental, paracetamol, midazolam, laudanosin
90	Mirtazapin	Mirtazapin
91	<i>desmetyldiazepam</i>	Negativ
92	<i>Sertralin</i>	Negativ
93	Paracetamol	<i>GHB</i> , paracetamol
94	Fenazon, <i>mianserin</i>	Fenazon
95	Negativ	Negativ
96	Paracetamol, <i>venlafaxin</i> , norvenlafaxin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, lamotrigin, metoklopramid, <i>propofol</i> , teofyllin	Paracetamol, Norvenlafaxin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, metoklopramid, teofyllin
97	Diazepam, desmetyldiazepam, <i>valproat, zopiklone, procyclidin</i>	Diazepam, desmetyldiazepam
98	Metoklopramid, oxycodon	Metoklopramid, oxycodon
99	<i>Venlafaxin</i> , norvenlafaxin, <i>moklobemid</i>	Norvenlafaxin
100	Negativ	Negativ
101	Karbamazepin, ketamine	Karbamazepin, ketamine
102	Negativ	Negativ
103	Paracetamol, citalopram, <i>noxiptiline</i>	Paracetamol, citalopram,
104	<i>Ibuprofen, paracetamol, diazepam, desmetyldiazepam, THC</i>	Negativ
105	Negativ	Negativ
106	Valproat, levetiracetam, <i>pentobarb, thiopental, desmetyldiazepam</i> , paracetamol	Valproat, paracetamol, levetiracetam
107	Negativ	Negativ
108	<i>Mepivacain</i> , bupivacain, <i>alimemazin, paracetamol, diazepam</i>	Bupivacain
109	Lamotrigin, levomepromazin	Lamotrigin, levomepromazin
110	<i>Ibuprofen</i>	Negativ
111	<i>Zopiklone</i>	Negativ
112	Metamfetmin, <i>diazepam, desmetyldiazepam</i>	Metamfetamin

Prøvenr.	Resultat fra metode "MED DRS"	Resultat fra metode "UTEN DRS"
113	Negativ	Negativ
114	<b>Citalopram</b>	Negativ
115	<b>Levetiracetam, alimemazin, olanzapin</b>	Negativ
116	Negativ	Negativ
117	Paracetamol, <b>mianserin</b> , kodein, diazepam, desmetyldiazepam, atropin	<b>GHB</b> , paracetamol, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, atropin
118	Terbinafine	Terbinafine
119	Negativ	Negativ
120	Negativ	Negativ
121	Paracetamol, ibuprofen	Paracetamol, ibuprofen, <b>GHB</b>
122	<b>Valproat</b> , paracetamol, <b>mianserin</b> , kodein, diazepam, desmetyldiazepam, atropin	<b>GHB</b> , paracetamol, kodein, desmetyldiazepam, diazepam, atropine
123	Manserin	Mianserin
124	<b>Ibuprofen, alimemazin</b>	Negativ
125	Klorprotixen, valproat, levomepromazin	<b>GHB</b> , klorprotixen, valproat, levomepromazin
126	Negativ	Negativ
127	Negativ	Negativ
128	Negativ	Negativ
129	Paracetamol, <b>midazolam</b> , laudanosin	Paracetamol, laudanosin
130	Negativ	Negativ
131	Negativ	Negativ
132	<b>Propofol</b> , paracetamol, thiopental, lidokain, kodein, <b>diklofenac</b> , ibuprofen	<b>Metronidazol</b> , paracetamol, tiopental, lidokain, kodein, ibuprofen, <b>metoprolol</b>
133	Negativ	Negativ
134	Negativ	Negativ
135	Negativ	Negativ
136	Diazepam, desmetyldiazepam, olanzapin	Diazepam, desmetyldiazepam, olanzapin
137	Pentobarbital, thiopental, ketamine, lidokaine, midazolam, laudonasin, desmetyldiazepam	Pentobarbital, thiopental, ketamine, lidokaine, midazolam, laudonasine, desmetyldiazepam
138	Lidokain	Lidokain
139	Negativ	<b>GHB</b>
140	Paracetamol	Paracetamol
141	Negativ	Negativ
142	Negativ	Negativ
143	Valproat	Valproat
144	Negativ	Negativ
145	Olanzapin	Olanzapin, <b>valproat</b>
146	Negativ	Negativ
147	<b>Atropin</b>	Negativ
148	<b>Klorprotixen</b>	<b>Paracetamol</b>
149	Negativ	Negativ
150	Valproat, lamotrigin, sulfapyridine	Valproat, lamotrigin, sulfapyridine
151	<b>Venlafaxin</b> , norvenlafaxin, diazepam, zopiklone	Norvenlafaxin, <b>GHB</b>
152	Negativ	Negativ
153	Propofol, paracetamol, <b>diazepam</b> , trimetoprim, <b>warfarin</b> , <b>meprobamat</b> ,	Propofol, paracetamol, trimetoprim
154	Negativ	Negativ
155	Negativ	Negativ
156	Fenytoin	Fenytoin
157	Diazepam, desmetyldiazepam	Diazepam, desmetyldiazepam

Prøvenr.	Resultat fra metode "MED DRS"	Resultat fra metode "UTEN DRS"
158	Negativ	Negativ
159	<i>Diazepam</i>	<i>Flecainid</i>
160	<i>Chlorcyclizin</i>	Negativ
161	Valproat	Valproat
162	Negativ	Negativ
163	Paracetamol, tramadol, <i>DMtramadol</i> , naproxen, mirtazapin	Paracetamol, tramadol, naproxen, mirtazapin, <i>klorprotixen</i>
164	Paracetamol	<i>GHB</i> , paracetamol
165	Negativ	Negativ
166	Amitriptylin	Amitriptylin
167	Negativ	Negativ

**Tabell 5.** Tabellen viser en oppsummering av antall stoff-funn i prøver 71-167 analysert på metodene MED DRS (158) og UTEN DRS (115). Analysetid på instrumentet var 14-og 24 minutter pr. prøve, rapporteringstid var henholdsvis ca. 3-og 15 minutter og den totale analysetid var ca. 27- og 63 timer.

	MED DRS	UTEN DRS
Antall treff, positive funn	158 stoffer	115 stoffer
Analysetid/instrument pr prøve	14 minutter	24 minutter
Avlesning/rapport pr.prøve	Ca. 3 minutter	Ca. 15 minutter
Total analysetid for 97 prøver	Ca. 27 timer	Ca. 63 timer

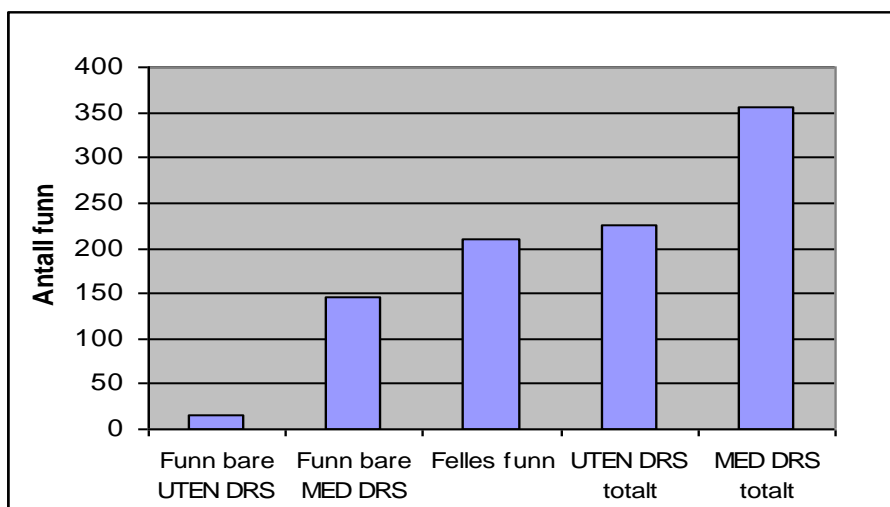


**Figur 26.** Histogrammet viser antall funn som ble gjort for prøver 71-167 (n=97) for metodene MED DRS (158) og UTEN DRS (115), funn som ble gjort på begge metoder (105) og funn som var unike for MED DRS (53) og UTEN DRS (10).

I tabell 6 og figur 27 er resultatet av prøvene 1-167 samlet. Til sammen ble det funnet 355 stoff-funn analysert på metoden DRS mot 226 på metoden UTEN DRS. Dette viser en økning på ca. 40 % flere stoff-funn. Den totale analysetiden ble redusert fra 109 timer til 47 timer, noe som tilsvarer en reduksjon på ca.60 %.

**Tabell 6.** Samletabell for prøver 1-167 viser forskjell i stoff-funn og brukt analysetid mellom metodene. Det ble gjort ca. 40 % flere stoff-funn i metoden MED DRS (335 funn) enn i metoden UTEN DRS (226 funn), og den totale analysetiden ble redusert fra 109 til 47 timer.

	<b>MED DRS</b>	<b>UTEN DRS</b>
Antall treff, positive funn	355 stoffer	226 stoffer
Kjøretid pr prøve	14 minutter	24 minutter
Avlesning/rapport pr.prøve	Ca. 3 minutter	Ca. 15 minutter
Total analysetid for 97 prøver	47 timer	109 timer



**Figur 27.** Samle-histogram over funn i prøver 1-167 (n=167) viser at det totale stoff-funn med metoden MED DRS var 355, mens ved metoden UTEN DRS var antallet 226, en økning av stoff-funn på ca. 40 %.

### 4.3 Kolonneforskjeller

For å finne eventuelle forskjeller på kolonnene, DB5-15m og HP5-30m, ble avlesningene av prøver som har ulike resultat med og uten deconvolution sammenlignet (77 prøver). Først ble resultater fra HP5-30m-kolonnen avlest med deconvolution og sammenlignet mot FT-DBL-referansebiblioteket. Resultater fra avlesning uten deconvolution og NIST05/PMWTOX-

bibliotek var allerede gjort. Likeens var det på instrument med DB5-15m-kolonne allerede gjort avlesning med deconvolution. I tillegg ble det gjort avlesning uten deconvolution mot biblioteket NIST05/PMWTOX.

Samlet ble avlesningene:

- Med deconvolution DB5-15m.
- Uten deconvolution DB5-15m.
- Med deconvolution HP5-30m.
- Uten deconvolution HP5-30m.

Eventuell differens av funn mellom HP5-30m og DB5-15m med eller uten deconvolution ville gi svar på om det er kolonneforskjell. Resultater er vist i tabell 7 og figur 28.

**Tabell 7.** Resultater av stoff-funn er sammenlignet på prøver som har ulike resultater med- og uten deconvolution på DB5-15m og HP5-30m kolonne (77 prøver) tatt ut fra tabell 2 og tabell 4. Funn av stoffer med og uten deconvolution på både DB5-15m og HP5-30m kolonner ble sammenlignet mot hverandre for å se om kolonnen hadde noen betydning for stoff-funn. Stoff-konsentrasjoner i  $\mu\text{M}$  er oppgitt i kolonne 2 for de stoffer som er kvantitert og gjelder for alle kolonnene i tabellen. Stoffer hvor det står (bekreftet), er bekreftetelse av stoff-funn i prøver 1-70, se vedlegg 8.

Prøvenr.	Funn med deconvolution, $\mu\text{M}$ kons., DB5-15m kolonne/ AMDIS-bibliotek FT-DBL-RTL. (funn >50 %)	Funn uten deconvolution, DB5-15m kolonne/ ChemStation- NIST/TOX-bibliotek	Funn med deconvolution/HP5-30m kolonne / AMDIS-bibliotek FT-DBL-RTL (funn >50 %)	Funn uten deconvolution/ HP5-30m kolonne / ChemStation- NIST/TOX-bibliotek
5	Metadon: 0,43, venlafaxin: 2,0, norvenlafaxin: 0,81, diazepam: 0,46, desmetyldiazepam: 0,33, levomepromazin: 0,49, paracetamol: 57	Venlafaxin, diazepam, levomepromazin, paracetamol	Metadon, venlafaxin, diazepam, levomepromazin, paracetamol	Metadon, venlafaxin, paracetamol
9	Karbamazepin, klorprotixen (bekreftet)	Negativ	Karbamazepin	Karbamazepin
11	Paracetamol: 89, oxycodon (bekreftet), fluconazole	Paracetamol, fluconazole	Paracetamol, fluconazole	Paracetamol, fluconazole
12	Klorfeniramin (bekreftet), diazepam: 0,32, desmetyldiazepam : 0,19	Diazepam	Negativ	Negativ
13	Valproat: 397, warfarin (bekreftet)	Valproat, warfarin	Valproat, warfarin	Valproat
14	Levetiracetam (bekreftet), paracetamol:112	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol
15	Kodein: 0,85, diazepam: 0,59, desmetyldiazepam : 0,11, paracetamol: 64, venlafaxin: 557, norvenlafaxin: 29, alimemazin: 0,4, klorfeniramin: 0,15, tramadol: 32, DMtramadol, naproxen, citalopram (bekreftet)	Kodein, diazepam, paracetamol, venlafaxin, norvenlafaxin, klorfeniramin, tramadol, DMtramadol, naproxen, citalopram.	Kodein, diazepam, desmetyldiazepam , paracetamol, venlafaxin, norvenlafaxin, alimemazin, klorfeniramin, tramadol, DMtramadol, naproxen, citalopram	Kodein, diazepam, paracetamol, venlafaxin, norvenlafaxin, alimemazin, klorfeniramin, tramadol, DMtramadol, naproxen, citalopram
17	Paracetamol: 9,8, venlafaxin (bekreftet)	Negativ	Paracetamol	Paracetamol
18	Mirtazapin:0,8, lidokain (bekreftet)	Mirtazapin	Mirtazapin	Mirtazapin
20	Metoklopramid: 3,1	Negativ	Metoklopramid	Negativ
21	Fluoxetin: 7,9, norfluoxetin: 8,4, quetiapin: 20,3, levomepromazin: 0,043	Fluoxetin	Fluoxetin, norfluoxetin, ibuprofen, valproat	Fluoxetin
23	Paracetamol: 12, diazepam: 0,44, desmetyldiazepam: 1,1, klorprotix: 1,6, ibuprofen: påvist klorcyclizin: (ikke metode), citalopram	Diazepam, desmetyldiazepam, klorprotixen	Paracetamol, diazepam, desmetyldiazepam , ibuprofen	Paracetamol, desmetyldiazepam
24	Levomepromazin: 1,9, venlafaxin (bekreftet)	Levomepromazin	Levomepromazin	Levomepromazin
25	Paracetamol:107, diazepam: 1,014, desmetyldiazepam: 0,439, kodein: 0,359	Paracetamol, desmetyldiazepam	Paracetamol, diazepam, kodein	Paracetamol, diazepam

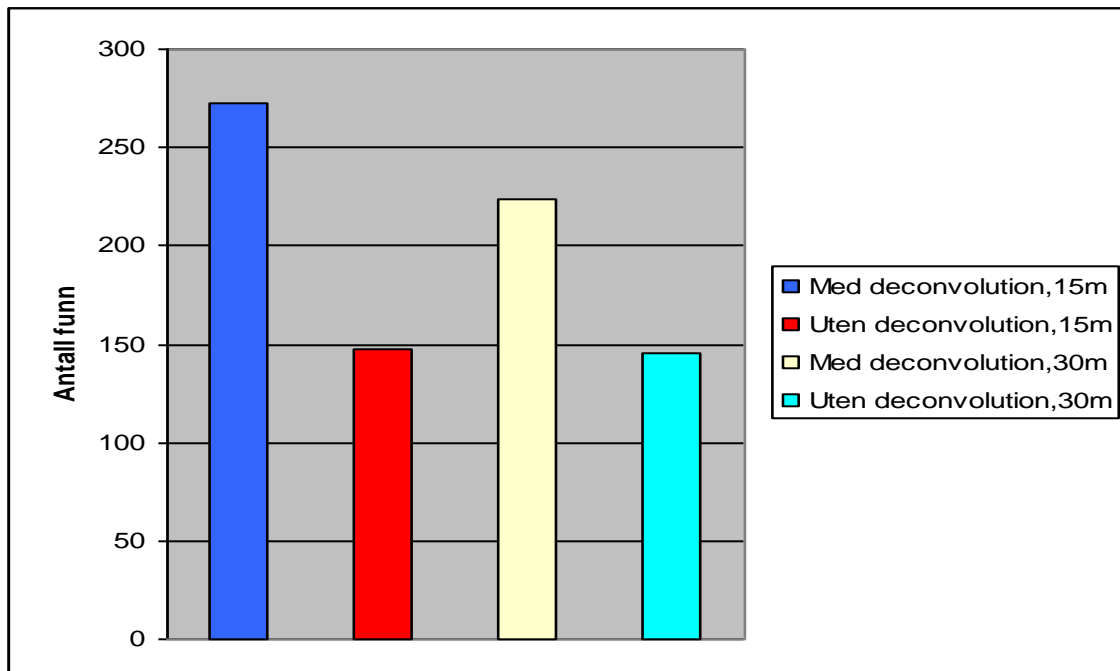
Prøvenr.	Funn GCMS3 med DRS, uM kons/15 meters kolonne.	Funn GCMS3 uten DRS, uten RTL, lest mot NIST/TOX	Funn GCMS4 med DRS/30 meters kolonne	Funn GCMS4 UTEN DRS/30meters kolonne
27	Paracetamol: 58	Negativ	Paracetamol	Negativ
29	Pentobarbital: 0.026, tiopental	Pentobarbital, tiopental	Pentobarbital, tiopental	Tiopental
30	Diazepam: 0.65, desmetyldiazepam: 0.706, alprazolam: 0.177	Diazepam, desmetyldiazepam	Diazepam, desmetyldiazepam	desmetyldiazepam
31	Metronidazole, diazepam: 0.584, desmetyldiazepam: 0.287	Metronidazole, diazepam, desmetyldiazepam	Metronidazole, diazepam, desmetyldiazepam	Metronidazole, diazepam
34	Karbamazepin, metoklopramid (bekreftet)	Karbamazepin	Karbamazepin	Karbamazepin
35	Trimipramin: 0.07	Negativ	Trimipramin	Negativ
36	Karbamazepin: 36, oxcarbamazepin: 4.8 (bekreftet)	Karbamazepin	Karbamazepin, oxcarbamazepin	Karbamazepin
41	Warfarin (bekreftet), desmetyldiazepam: 0.140	Warfarin	Warfarin, desmetyldiazepam	Negativ
42	Paracetamol: 0.591, venlafaxin: 1.425, norvenlafaxin: 4.35, mirtazapin: 1.15, kodein: 3.92, desmetyldiazepam: 0.543, diazepam: 0.207, zopiklon: 4.91	Paracetamol, norvenlafaxin, mirtazapin, kodein, desmetyldiazepam, diazepam, zopiklon	Paracetamol, norvenlafaxin, mirtazapin, kodein, desmetyldiazepam, diazepam, zopiklon	Paracetamol, norvenlafaxin, mirtazapin, kodein, zopiklon
44	Paracetamol: 97, pentobarbital, tiopental, ketamin, norketamin, sulfodiazin, midazolam: 1.907, laudanosin	Paracetamol, pentobarbital, midazolam.	Paracetamol, pentobarbital, tiopental, ketamin, midazolam, laudanosin	Paracetamol, ketamin, midazolam
45	Ketamine, norketamine, flekainid (ikke bekreftet)	Ketamin	Ketamine, norketamine	Ketamine
46	Mirtazapin: 0.97, oxazepam: 2.30	Mirtazapin, oxazepam	Mirtazapin	Mirtazapin
48	Ketamin, norketamin	Ketamin, norketamin	Ketamin, norketamin	Ketamin
50	Paracetamol: 799, karisoprodol: 41, meprobamat: 174, mianserin: 1.45, DMmianserin: 3.23., norpropoxyfen (bekreftet), diazepam: 0.315, desmetyldiazepam: 1.23, levomepromazin: 0.821, olanzapin (bekreftet), temazepam (ikke metode), zolpidem (bekreftet).	Paracetamol, karisoprodol, meprobamat, mianserin, DMmianserin, levomeprom.	Paracetamol, karisoprodol, meprobamat, metoprolol, mianserin, DMmianserin, norpropoxyfen, levomepromazin, zolpidem	Paracetamol, karisoprodol, meprobamat, metoprol, mianserin, DMmianserin levomepromazin
51	Venlafaxin	Negativ	Negativ	Negativ
52	Diazepam: 0.261, desmetyldiazepam: 0.233	Diazepam, desmetyldiazepam, paracetamol	Diazepam, desmetyldiazepam, paracetamol	Paracetamol

Prøvenr.	Funn GCMS3 med DRS, uM kons/15 meters kolonne.	Funn GCMS3 uten DRS, uten RTL, lest mot NIST/TOX	Funn GCMS4 med DRS/30 meters kolonne	Funn GCMS4 UTEN DRS/30meters kolonne
53	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, amitriptylin (bekreftet), kodein: 0.513, klomipramin (bekreftet), diazepam, desmetyldiazepam, klozapin (bekreftet)	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, amitriptylin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam	Paracetamol, meprobamat, karisosoprodol, amitriptyline, kodein, klomipramin, diazepam, desmetyldiazepam	Paracetamol, meprobamat, karisoprodol, kodein, diazepam, desmetyldiazepam
54	Venlafaxin: 1.34, norvenlafaxin: 1.79, diazepam: 0.101, desmetyldiazepam: 0.093	Venlafaxin, norvenlafaxin	Venlafaxin, norvenlafaxin, diazepam, paracetamol, ibuprofen,	Venlafaxin, norvenlafaxin, ibuprofen
55	Paracetamol: 50, mianserin: 0.093, zolpidem: 0.121	Paracetamol	Paracetamol, mianserin	Paracetamol, mianserin
56	Diazepam: 0.079, desmetyldiazepam: 0.135	Negativ	Negativ	Negativ
58	Ibuprofen (bekreftet): 40, tamoxifen, paracetamol: 64	Tamoxifen, paracetamol	Ibuprofen, tamoxifen, paracetamol	Tamoxifen, paracetamol
59	Ketamin, norketamin, lidokain, laudanosin, norvenla.	Ketamin, lidokain	Ketamin, norket, lidokain, laudanosine	Ketamin, lidokain
60	Paracetamol: 41, pentobarbital, diazepam: 0.098, desmetyldiazepam: 0.098, midazolam (bekreftet): 0.158	Paracetamol	Paracetamol, pentobarbital, tiopental, diazepam, desmetyldiazepam, midazolam	Paracetamol
62	Alimemazin: 1.216, citalopram: 9.396, alprazolam: 1.625, zopiklon (bekreftet): 2.991, paracetamol: 606	Alimemazin, citalopram, paracetamol.	Alimemazin, citalopram, alprazolam, zopiklon, paracetamol.	Alimemazin, citalopram, alprazolam, paracetamol.
64	Paracetamol: 0, ibuprofen	Negativ	Ibuprofen	Negativ
67	Valproat: 134, THC: 0.0089, levomepromazin: 0.353	Valproat, levomeprom.	Valproat, paracetamol, levomepromazin	Valproat, paracetamol, levomepromazin
68	Alimemazin (bekreftet), zopiklon: 1.041	Paracetamol	Paracetamol, alimemazin	Paracetamol
69	Kodein: 0.413, paracetamol: 452	Paracetamol	Kodein, paracetamol	Paracetamol
70	Lidokain, bupivacain, diazepam: 0.243, desmetyldiazepam: 0.042, paracetamol: 13, pentobarbital, tiopental	Lidokain	Lidokain, bupivacain, diazepam, paracetamolamol, pentobarbital, tiopental	Lidokain, paracetamol
72	Karbamazepin: 11, morf: 6.7, 6-MAM, kodein: 0.29, paracetamol: 23, desmetyldiazepam: 0.032, levomepromazin: 0.011	Karbamazepin, morfin, kodein, paracetamol, desmetyldiazepam	Karbamazepin, morfin., kodein, paracetamol, desmetyldiazepam.	Karbamazepin, morfin, kodein, paracetamol
73	Pentobarb, tiopental, klorprotixen: 0.083, trimipramin: 0.024	Negativ	Alimemazin	Negativ
77	Pentobarbital	Negativ	Negativ	Negativ



Prøvenr.	Funn GCMS3 med DRS, uM kons/15 meters kolonne.	Funn GCMS3 uten DRS, uten RTL, lest mot NIST/TOX	Funn GCMS4 med DRS/30 meters kolonne	Funn GCMS4 UTEN DRS/30meters kolonne
82	Diazepam (ikke kvant), donepezil	Negativ	Diazepam., donepezil	Negativ
86	Metronidazol, midazolam: 0.72, paracetamol:<?, diazepam: 0.2, propofol, pentobarbital	Metronidazol, midazolam, paracetamol, propofol	Metronidazol., midazolam, paracetamol, diazepam, propofol, pentobarbital	Metronidazol, midazolam, paracetamol, diazepam, propofol
88	Warfarin., metronidazol, paracetamol: 31, midazolam: 64, fentanyl:1.36, laudanosin	Metronidazol, paracetamol, midazolam, laudanosin	Warfarin, metronidazol, paracetamol, midazolam, fentanyl, laudanosin	Metronidazol, paracetamol, midazolam, fentanyl, laudanosin
89	Metronidazol, pentobarbital, tiopental, paracetamol:0, midazolam:0.77, morfin:17.1, laudanosin	Metronidazol, pentobarbital, tiopental, midazolam, morfin, laudanosin	Metronidazol, pentobarbital, tiopental, paracetamol, midazolam, laudanosin	Metronidazol, pentobarbital, tiopental, paracetamol, midazolam, laudanosin
91	desmetyldiazepam: 0	Negativ	desmetyldiazepam	Negativ
92	Sertralin:0.306	Negativ	Negativ	Negativ
94	Fenazon, mianserin: 0.069	Fenazon	Fenazon, mianserin	Fenazon
96	Paracetamol: 402, venlafaxin: 1.152, norvenlafaxin: 8.2, kodein: 1.158, diaepamz: 0.51, desmetyldiazepam: 1.186, lamotrigin: 0.05, propofol: <0.28, metoklopramid: 0.95, teofyllin: 101	Paracetamol, norvenlafaxin, diazepam, desmetyldiazepam, metoklopramid, teofyllin,( kodein dekt av annen topp)	Paracetamol, venlafaxin, norvenlafaxin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, metoklopramid, propofol, teofyllin, ibuprofen	Paracetamol, norvenlafaxin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, metoklopramid, teofyllin
97	Diazepam: 0.35, desmetyldiazepam: 0.32, valproat: 0, zopiklon: 1.25, procyclidin	desmetyldiazepam	Diazepam, desmetyldiazepam, valproat	Diazepam, desmetyldiazepam
99	Venlafaxin: 2.66, norvenlafaxin: 7.78, moklobemid: 0	Norvenlafaxin	Venlafaxin, norvenlafaxin	Norvenlafaxin
104	Ibuprofen, paracetamol: 0, diazepam: 0.185, desmetyldiazepam:0.187, THC:0.0194	Ibuprofen, paracetamol,	Ibuprofen, paracetamol, diazepam	Negativ
106	Valproat: 527, levetiracetam: 0.955, pentobarbital, tiopental, desmetyldiazepam: 0.056, paracetamol: 63.5,	Valproat, levetiracetam, paracetamol	Valproat, levetiracetam, pentobarbital, paracetamol	Valproat, levetiracetam, paracetamol,
108	Mepivacain, bupivacain: 2.03, alimemazin: 0.04, paracetamol: 0, diaz: 0.019	Bupivacain, paracetamol	Bupivacain, paracetamol	Bupivacain
110	Ibuprofen	Negativ	Ibuprofen	Negativ
111	Zopiklon: 0.493	Negativ	Negativ	Negativ
112	Metamfetamin: 91, diazepam: 0.149, desmetyldiazepam: 0.281	Metamfetamin, desmetyldiazepam	Metamfetamin., diazepam, desmetyldiazepam	Metamfetamin
114	Citalopram: 0.388	Citalopram	Citalopram	Negativ

<b>Prøvenr.</b>	<b>Funn GCMS3 med DRS, uM kons/15 meters kolonne.</b>	<b>Funn GCMS3 uten DRS, uten RTL, lest mot NIST/TOX</b>	<b>Funn GCMS4 med DRS/30 meters kolonne</b>	<b>Funn GCMS4 UTEN DRS/30meters kolonne</b>
115	Levetiracetam: 0, alimemazin: 0.185, olanzapin: 0.805	Olanzapin	Alimemazin	Negativ
117	Paracetamol:108, mianserin:0.071, kodein:1.56, diazepam: 0.062,desmetyldiazepam: 0.145, atropin	Paracetamol, mianserin,, kodein atropin	Paracetamol, mianserin, kodein, diazepam, desmetyldiazepam, atropin	GHB, paracetamol, kodein, desmetyldiazepam, diazepam, atropin
124	Ibuprofen, Alimemazin: 0.066	Negativ	Alimemazin	Negativ
129	Paracetamol: 32, midazolam: 0.201, laudanosine	Paracetamol, midazolam, laudonazine,	Paracetamol, midazolam, laudanosine	Paracetamol, laudanosine
132	Propofol, paracetamol: 126, thiopental, lidokain, kodein: 1.174, diklofenac, ibuprofen	Paracetamol, lidokain	Propofol, metronidazol, paracetamol, tiopental, pentobarbital, lidokain, kodein, ibuprofen, metoprolol	Metronidazol, paracetamol, tiopental, lidokain, kodein, ibuprofen, metoprolol: 0.34
145	Olanzapin: 0.972	Negativ	Olanzapin, valproat: 0	Olanzapin
147	Atropin	Negativ	Negativ	Negativ
148	Klorprotix: 0	Negativ	Paracetamol	Paracetamol
151	Venlafaxin: 0.254, norvenlafaxin: 0.678, diazepam: 0.187, zopiklon: 0.156	Diazepam	Venlafaxin, norvenlafaxin, diazepam, desmetyldiazepam: 0.120	Norvenlafaxin, GHB
153	Propofol, paracetamol: 462, diazepam: 0.134, trimetoprim, warfarin, meprob: 0	Propofol, paracetamol, trimetoprim	Propofol, paracetamol, diazepam, trimetoprim warfarin	Propofol, paracetamol, trimetoprim
159	Diaz: 0	Flecainid: 0.97	Flecainid	Flecainid
160	Klorcyclizin	Negativ	Negativ	Negativ
163	Paracetamol: 68, tramadol: 1.5, DMtramadol, naproxen, mirtazapin: 0.309, diazepam: 0.036	Paracetamol, tramadol, DMtramadol, naproxen, diazepam, mirtazapin, klorprotixen: 0	Paracetamol, tramadol, naproxen, mirtazapin,	Paracetamol, tramadol, naproxen, mirtazapin, klorprotix: 0
164	Paracetamol: 317	Paracetamol	Paracetamol	Paracetamol, GHB: 414
77 prøver	Antall funn 15m med deconvolution: 279, herav 6 negative svar	Antall funn 15m uten deconvolution: 148, herav 1 negativt-svar	Antall funn 30m med deconvolution:225, herav1 negativt-svar	Anatll funn 30m uten deconvolution:145, herav 1 negativt svar



**Figur 28.** Figuren viser en sammenligning av de 77 prøver som har ulike stoff-funn med og uten deconvolution. Sammenligningen gikk på å undersøke om kolonnene hadde forskjellig innvirkning på funnresultatet. Alle prøvedata ble først sammenlignet mot FT-biblioteket med deconvolution på både DB5-15m- og HP5-30m kolonner. Deretter ble prøvedata sammenlignet mot referansebibliotek NIST05/TOX uten deconvolution på begge kolonner. Histogrammet viser stoff-funn ved de forskjellige kombinasjoner. Resultatet viser omtrent det samme antall funn uten deconvolution i både DB5-15m og HP5-30m kolonne (147 og 144), mens med deconvolution er det 18 % flere funn ved DB5-15m enn ved HP5-30m (273 og 224). Deconvolution vil medføre at flere stoffer i lave konsentrasjonsområder blir detektert. Ved metoden uten deconvolution både på DB5-15m og HP5-30m vil mange av disse stoffene ikke bli funnet. Dette kan bety at DB5-15m-kolonnen gir en bedre deteksjon av stoffer i lave konsentrasjoner. I høyere konsentrasjoner hvor også uten deconvolution finner de fleste stoffene vil det ikke bli noen forskjell i funn.

## 5. Diskusjon

Hensikten med denne studien var å utføre en GCMS scan-metode av rettsmedisinske blodprøver for å undersøke hvorvidt en deconvolution-teknikk og en ny DB5-15m kolonne vil gi en sikrere og ressurs sparende analyse, sammenlignet med den nåværende metoden uten deconvolution og med en HP5-30m kolonne. Analysen viste en forbedring i antall identifiserte stoffer på 40 %, og det ble estimert en 60 % tidsbesparelse ved å benytte metoden MED DRS sammenlignet med metoden UTEN DRS.

### 5.1 Fordeler med ny metode

Deconvolution løser kromatografiske problemer som dårlig separasjon og ko-eluerende stoffer. Deteksjonsundersøkelsen i figur 24 og vedlegg 6 viser dette. Ved hjelp av matematiske algoritmer sorterer deconvolution ut hva som er støy og hva som er reelt stoff, og de rensede spektre til stoffer som er skjult under andre topper blir funnet, sammenlignet mot referansespekter og kommer ut i svarrapport. Figur 27 viser også at deteksjonen økte med ca. 10x. når deconvolution ble benyttet i forhold til metoden uten deconvolution. Undersøkelsen (vedlegg 7) viser også at recovery er jevnt over bedre med DRS. Histogrammet over 167 ekstraherte prøver i figur 27 viser også at det er en forbedring både med tanke på antall funn og ressursinnsparing ved den nye DRS-metoden og ny DB5-15m kolonne. Det ble gjort ca. 40 % flere stoff-funn ved den nye metoden i forhold til metoden UTEN DRS. Funnene som ble bekreftet viste at metoden med deconvolution ga en klar forbedring, og DRS-rapporten gir i tillegg en klar tidsmessig gevinst. Med tanke på tidsbesparelse medførte DRS-rapportering ca. 12 minutter kortere tid for resultatanalyse pr. prøve. I tillegg ble analysetid på instrumentet redusert med 10 minutter pr. prøve ved bruk av DB5-15m kolonnen. En total reduksjon på ca. 61 timer for alle prøvene gir en vesentlig innsparing av ressursbruk, i tillegg til den nye DRS-metodens evne til å finne flere stoff. Dette er svært viktig i rettsmedisinsk sammenheng.

## 5.2 Recovery-deteksjonsforsøk

Et recovery/deteksjonsforsøk med direkteinjeksjoner av 18 forskjellige stoffer viser at deteksjonen av de fleste stoffer ved metoden MED DRS og DB5-15m-kolonne er bedre enn UTEN DRS og HP5-30m kolonne (figur 24). Utvalget av disse stoffene ble gjort for å få variasjon både i MW, logP, pKa-verdi, flyktighet (kokepunkt) og retensjon (tabell 1). Det ble gjort både en basisk og sur ekstrahering/opparbeidelse. Samtidig ble det injisert direkteløsninger for å undersøke recovery på ekstraksjonsmetoden. Strukturen og de kjemiske egenskaper ved stoffene som pKa, logP og flyktighet samt polaritet og stasjonærfase på kolonnen kunne forklare hvorfor stoffene oppførte seg slik de gjorde.

Diazepam, var for eksempel et stoff som kromatograferte bra med ei fenylgruppe, stoffet ioniserte lett på grunn av nitrogenatomene, lav pKa og gunstig kokepunkt. Retensjonen var bra på begge metoder/kolonner noe medførte at kromatografien ble lettere leselig enn når stoffer hadde liten retensjon. Fenobarbital hadde liknende struktur, med ei fenylgruppe, hadde høyere pKa, lavere kokepunkt og kromatograferte best ved surt ekstrakt, antagelig på grunn av sine oksygen-atomer som ble negativt ladet. Metoprolol, derimot var på grunn av sin OH-gruppe mer polart, kromatograferte dårligere og ble detektert først ved høyere konsentrasjoner. Stasjonærfasene i kolonnene var begge under middels polar med 5 % fenyl, og det var derfor best kromatografi med upolare stoffer. Polare stoffer som salicylsyre og amfetamin gir begge liten retensjon, disse har i tillegg lavt kokepunkt og er flyktige. Butyrolacton (GHB) er et stoff som ikke er med i denne deteksjonsundersøkelsen, men er et stoff som av og til ble funnet i metoden UTEN DRS og ikke i MED DRS (tabell 2 og 4). Alle disse tre stoffene er lettest detekterbar ved derivatisering.

En forbedring av deteksjon med deconvolution på ca.10x kan forklares med deconvolution-algortimene som løser opp toppen og gir svar på hver enkelt av toppene. I en blod-matriks med 18 forskjellige tilsatte stoffer, er det stor sannsynlighet for at noen av stoffene eluerer nesten samtidig og har dårlig separasjon. Lignende undersøkelser bekrefter problemene ved avlesning av scan med konvensjonell metode uten DRS, der det også var gjort

sammenlignende undersøkelser uten og med DRS [23, 24]. Dessuten er det i blod mange endogene stoffer som vil eluere og potensielt kunne forstyrre avlesningen; topper ligger delvis over hverandre, og separasjonen er dårlig. Metoden UTEN DRS bruker spekteret ved integreringstiden av TIC-toppen, og dette vil være en blanding av spektre fra alle stoffene i TIC-toppen, men med størst innflytelse av stoffet med denne RT. Et eksempel på dette finnes ved basisk ekstraksjon av kodein og klomipramin i deteksjonsforsøk (vedlegg 6) i metoden UTEN DRS med kolonnen HP5-30m. Selv om kolonnen HP5-30m er lengre enn DB5-15m og analytter dermed vil spres over en større kolonnenlengde, har de to stoffene relativt lik retensjon, med RT på henholdsvis 15.03 og 15.05 minutter. Dette medfører dårlig separasjon og deteksjon som igjen medfører at spektre ikke blir rene stoffspektre, men en blanding av flere. Metoden MED DRS med deconvolution teknikken løser opp topper som ikke er separert, algoritmer avgjør om det er støy eller aktuelle stoff og spektre fra alle ko-eluerte topper blir identifisert. Både kodein og klomipramin fra forrige eksempel ble detektert ved den nye metoden selv om de kromatografiske toppene nesten dekker hverandre (vedlegg 9). Ved konsentrasjoner i lave områder er dette et vesentlig bidrag til at stoffer blir registrert. I metoden UTEN DRS vil små topper (lave konsentrasjoner av stoffer) forsvinne i de mange matriks-toppene. Matriks-effekter kan i tillegg ha forskjellig innvirkning i forskjellige konsentrasjonsområder. Dette observeres også i deteksjonen av kodein og klomipramin (vedlegg 6) der analyttene delvis overlappes av oktanamid, et endogent nedbrytningsstoff i blod med RT 15.0 minutter, og kodein blir kun identifisert ved 5000 nM, men ikke ved 1000 nM eller 10000 nM.

Direkteinjeksjonene sammenlignet med ekstraherte prøver forteller hvor bra stoffene går over i organisk fase under ekstraksjonen (vedlegg 7 og figur 36). Det viser seg at recovery varierte fra 5-100 %. Særlig tilfellene der recovery var over 100 % skyldes nok at avlesningen er automatisk av et scan og derved ikke så nøyaktig som ved kvantitativ analyse. Eksempelvis er desmetyldiazepam som ble funnet ved 10 nM i en ekstrahert prøve med metoden MED DRS, men kun ved 50 nM ved direkteinjeksjoner på samme metode. Antagelig hadde resultatene vært mer like om konsentrasjonsintervallene hadde vært kortere, for eksempel 10-20-30 nM osv. Det samme gjelder stoffet klozapin i metoden MED DRS. Når det gjelder salicylsyre ble det ved begge metoder ikke noe funn på direkteinjeksjoner, mens det ved sur ekstraksjon ble

funn ved 50000 nM (vedlegg 6). Disse funnene kan skyldes tilfeldigheter som at konsentrasjonsintervallene er for lange, analysen ble gjort kun en gang eller at en full scan kvalitativ analyse ikke opererer med så stor nøyaktighet som en kvantitativ analyse. I figur 36 i vedlegg 7 er direkteinjeksjoner fra MED DRS og UTEN DRS sammenlignet. Resultatet bekrefter tidligere funn ved ekstraherte prøver at metoden MED DRS har langt bedre deteksjon enn UTEN DRS.

### 5.3 Ekstrahering av 167 blodprøver fra obduksjoner

Samlehistogrammet i figur 27 viser resultater av 167 ekstraherte blodprøver fra obduksjoner, injisert og avlest mot scan-metodene UTEN DRS med HP5-30m kolonne og MED DRS med DB5-15m kolonne. Sammenligning av disse metodene ble gjort for å se om det var forskjell i antall stoff-funn og hvor sikre disse var. Disse resultatene var samlet etter både sur og basisk ekstraksjon av prøvene. Av tabellene 2 og 4 sees at de fleste stoffer som ble funnet i metoden UTEN DRS også finnes i metoden MED DRS. I tillegg ble det funnet ca. 40 % flere stoff i metoden MED DRS. Bare en del av funnene ble kvantitert og bekreftet da viktigheten av funnene ble vurdert i hver enkel obduksjonssak. Kvantitering og bekreftelse av prøvene er ressurskrevende og blir kun gjort i de tilfeller det har betydning for dødsårsak dersom det er nok prøve-materiale igjen. For å kvalitetssikre den nye metoden, ble unike stoff-funn som ble gjort med metode MED DRS fra prøvene 1-70 (vedlegg 8) bekreftet ved å injisere samme prøve-vials på et LCMS-instrument på en SIM-metode og sammenlignet mot en standard av aktuelt stoff. Her ble de aller fleste ulike stoff-funn bekreftet positiv. To stoffer var negativ ved bekreftelse, men disse var i utgangspunktet usikre treff. To stoffer manglet SIM-metoder, og det ble heller ikke brukt ressurser på utvikling av disse. Av 29 prøver ble da 25 positivt bekreftet, to negativt og to var det ikke SIM metode på. Disse resultatene viser at kvaliteten på analysen MED DRS er tilfredsstillende. Ulike stoff-funn på de resterende 97 prøver (prøvenr. 71-167) som ble ekstrahert, ble delvis bekreftet av samme årsak som nevnt ovenfor.

Erfaringsmessig måtte prosenttreff på funn være over 50 % for å defineres som interessant. Funn som er like over 50 % ble nøye undersøkt fordi dette er et lavt treff, og resultatene av

disse må alltid bekreftes. Eksempler på falske positive svar finnes i tabell 7 og noen av disse er nevnt nedenfor.

Eksempel på noen stoffer som var negative ved bekreftelse:

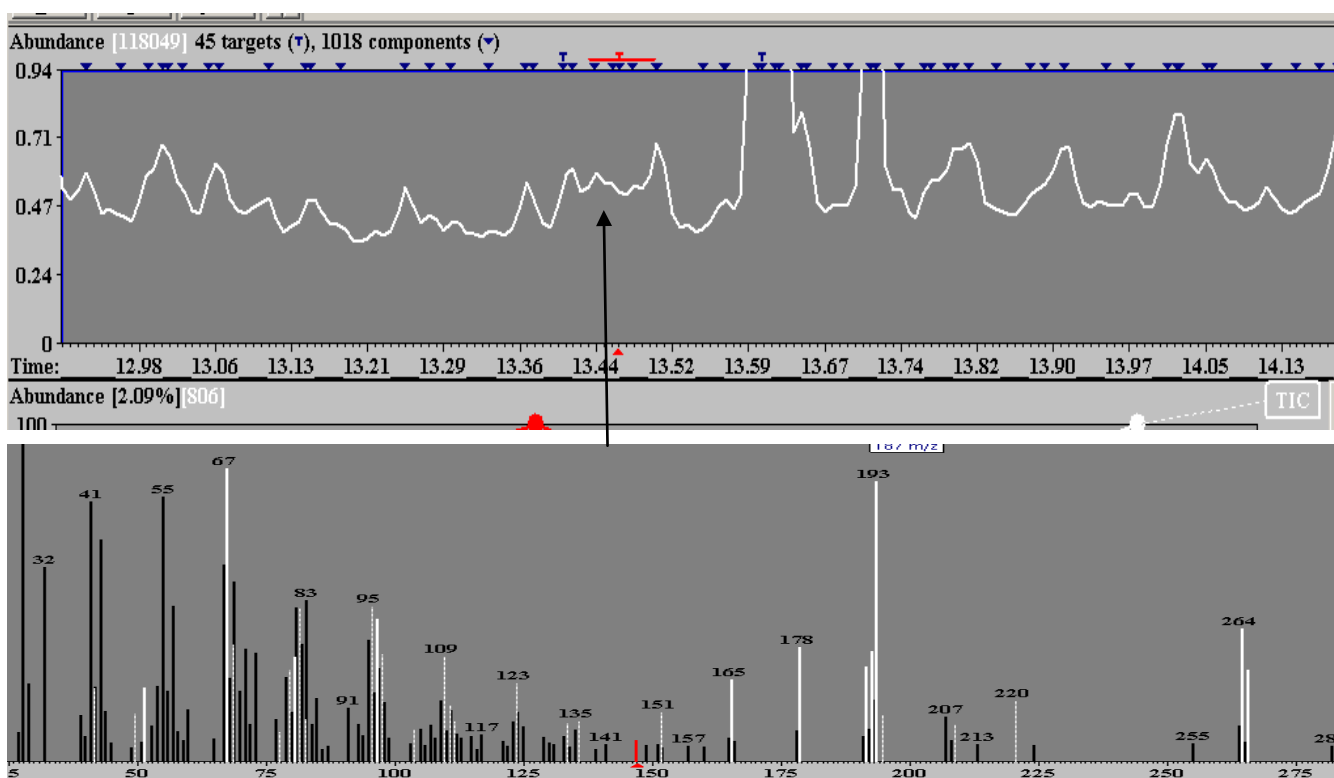
- Prøve 91-desmetyldiazepam: 60 % treff, RT = +5 sekunder fra kalibrert tid
- Prøve 115-Levetiracetam: 52 % treff, RT = -18 sekunder fra kalibrert tid.
- Prøve 148-Klorprotixen: 54 % treff RT = -15 sekunder fra kalibrert tid.
- Prøve 153-Meprobamat: 50 % treff, RT = +3 sekunder fra kalibrert tid.

De falske positive funnene hadde treffprosent mellom 50 og 60 % og var høyst usikre før bekreftelse ble gjort. En avveining må gjøres om kravet til treffprosenten bør settes over 60 % for å unngå falske positive funn. Et eksempel som taler mot dette og at treffprosenten fortsatt bør være 50 % er vist i figur 29. Der er mianserin (antidepressiv) funnet i en lav konsentrasjon med 54 % treff og funnet ble bekreftet. God funnsikkerhet ble imidlertid også bekreftet ved at de fleste kvantiteringer og bekreftende analyser som ble gjort, viste positive funn. Unntak er paracetamol som av og til bekreftes negativ. Dette kan være på grunn av at deteksjonsgrense på SIM-metode er lavere enn på scan-metoden.

I noen prøver er GHB og paracetamol funnet kun i metode UTEN DRS. Begge disse stoffene er polare og kromatograferer dårlig. GHB har liten retensjon og gir en kromatografisk utflytende topp. Paracetamol gir også en kromatografisk bred topp. Da metoden MED DRS er RT-låst med et tidsintervall satt til +/-20 sekunder, vil brede, utflytende topper resultere i RT som går utenom tidsintervallet og stoffet vil følgelig ikke komme i DRS-rapporten. Det er stort sett disse to stoffene som utgjør funn i metoden UTEN DRS og ikke i MED DRS. Prøvene i eksempel ovenfor som var negativ ved bekreftelse hadde variasjon fra 5 til 18 sekunder fra kalibrert tid. Snevres prosent-treff og RT- intervallet inn, vil kanskje noen stoffer gå tapt, men samtidig kan falske positive prøver unngås. Ved gjennomgang av svar-rapporten, må prøver med lav treffprosent og/eller RT som avviker mye fra kalibrert tid, alltid sjekkes nærmere, både angående %-treff, RT og spekter og bekreftes/avkreftes ved kvantitativ analyse.

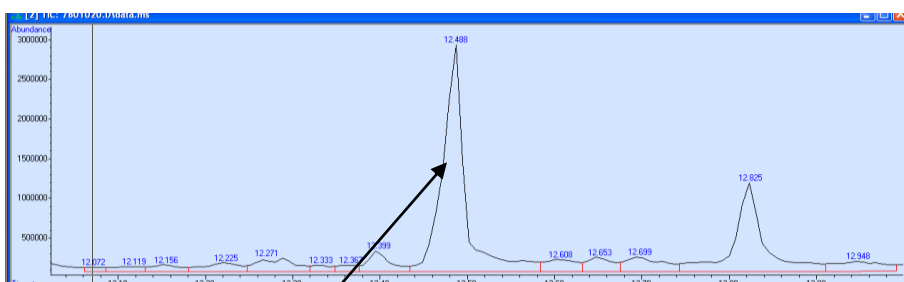


Funn som er gjort i metode MED DRS og ikke i UTEN DRS er ofte stoffer i lave konsentrasjoner. Dette stemmer godt med evnen deconvolution har til å løse opp toppler og ekstrahere ut hva som er støy og hva som er reelt stoff. UTEN DRS-metoden klarer ikke å skille dette i lave konsentrasjonsområder, det blir et urent spekter og referansebiblioteket klarer ikke å identifisere stoffet. Figur 29 viser et eksempel på stoff-funn (mianserin, tabell 7, prøve 94) som ved hjelp av deconvolution detekterer stoffet selv om toppen ligger i støyområdet.

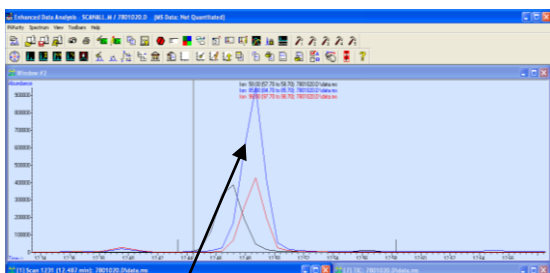


**Figur 29:** Figuren øverst viser et eksempel hvor mianserin (antidepressiv) ble funnet ved deconvolution i en lav konsentrasjon ( $0,069\mu\text{M}$ -54 % treff) ved RT 13.46 minutter. Mianserin-toppen er gjemt i støyen, men deconvolution klarer likevel å skille ut mianserin som funn. Under vises spekteret av toppen, sort spekter er scanspekter uten deconvolution, hvitt er deconvolutert spekter. Mianserins hovedfragmenter er  $m/z$  193, 264, 178, 165. Uten deconvolution er ikke stoffet detekterbart.

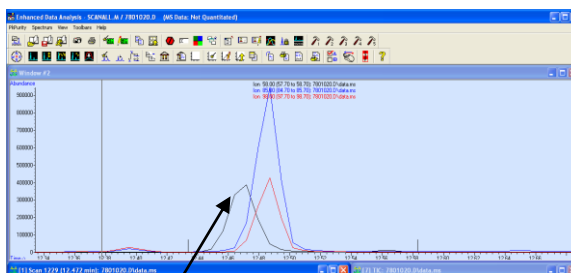
Figur 30 viser et eksempel på to overliggende topper. Dette er høyere topper og konsentrasjoner enn ved figur 29, men Chemstation klarer allikevel ikke å separere toppene, og spekteret blir mest dominert av den høyeste toppen ved RT 12.488 minutter som er decanamid (endogent nedbrytningsstoff). Ved deconvolution derimot blir det registrert to topper, på henholdsvis 12.472 og 12.488 minutter. Spektrene blir deconvolutert, og hver enkelt av de ”rensede” spekter blir sammenlignet mot referansebibliotek med resultatet decanamid ved 12.488 og venlafaxin (antidepressiv) ved RT 12.472 minutter.



1) Pilen viser TIC-toppen som inneholder begge toppene som er i figur b og c.



2) Decanamid (naturlig nedbrytningsstoff), RT 12.488.



3) Venlafaxin (antidepressiva), RT 12.472 minutter.

**Figur 30.** Eksemplet øverst 1) viser et TIC-kromatogram fra Chemstation, 2) i biblioteksøk UTEN DRS gis svaret ”Decanamid”, 3) i biblioteksøk MED DRS gis svaret venlafaxin som er et antidepressiv.

## 5.4 Kolonnens betydning

Metoden MED DRS og DB5-15m kolonne kan sees som en samlet forbedring av stoff-funn. For å finne hvilken betydning kolonnene har, ble prøver med forskjellige funn i de to metodene (77 prøver) fra sammenligningen MED DRS og UTEN DRS avlest slik som det er punktvis satt opp i kap.4.3. Resultater fra med- og uten deconvolution avlest både mot DB5-

15m- og HP5-30m- kolonnene er samlet i tabell 7 og figur 28. Ved sammenlikningen av stoff-funn uten deconvolution på begge kolonner mot samme bibliotek, ble det funnet henholdsvis 147 og 144 stoffer på DB5-15m- og HP5-30m kolonnene. Dette viser at kolonne-forskjellen ikke har noen betydning når deconvolution ikke brukes.

Ved sammenlikning av stoff-funn med deconvolution på begge kolonner tatt ut mot samme bibliotek er det derimot en forskjell på 18 %. Forskjellen på 18 % ved bruk av deconvolution og ingen forskjell uten deconvolution ved kolonnesammenlikningen, kan kanskje indikere at det vises en forskjell når lave stoff-konsentrasjoner måles. Bruk av deconvolution gir i utgangspunktet mye bedre deteksjon i lave konsentrasjonsområder enn uten deconvolution. I tillegg viser tabell 7 at en del av forskjellen på 18 % utgjøres av stoffer i svært lave konsentrasjoner som blir funnet på DB5-15m- kolonne, men ikke på HP5-30m-kolonne, begge med deconvolution. Et representativt eksempel er prøvenr. 108 i tabell 7. Her ble alimemazin (0.04 $\mu$ M) og diazepam (0.019  $\mu$ M) funnet kun med deconvolution og DB15m-kolonne. Et annet eksempel er prøve 72 hvor diazepam og levomepromazin også kun ble funnet med deconvolution og DB5-15m-kolonnen. Disse stoffene ble ikke funnet med deconvolution og HP5-30m-kolonne. Dette er to av flere eksempel som kan tyde på at den nye kolonnen har bedre deteksjon og utgjør kolonneforskjellen. En DB5-15m kolonne vil ha høyere og spissere topper (mindre longitudinell diffusjon) enn HP5-30m kolonne ved samme stoffkonsentrasjon og resolusjonen kan være bedre og gi lavere deteksjonsgrenser. Ved kolonnesammenlikning uten deconvolution er det stoff med høyere konsentrasjoner som ble funnet, og stoff-funnene ble stort sett de samme for begge kolonnene. I vedlegg 10 er det utregnet et eksempel på kromatografisk resolusjon mellom kodein og klomipramin i en standard på begge kolonner. Resolusjonen på DB5-15 meter kolonnen er 1.074 som nesten er grunnlinjeseparasjon. På HP5-30m-kolonnen er resolusjonen 0.574, og topper er dårlig separert. Dette viser seg også i deteksjonsforsøket, der kodein er gjemt under klomipramintoppen (vedlegg 9). Men ved full scan-analyser av prøver med flere hundre elurende topper, blir oppløsningen forskjellig mellom de ulike topper. Noen stoffer skilles bra, men andre vil være overliggende. Bruk av deconvolution er her avgjørende da denne teknikken finner stoffenes spekter selv om det er kontaminerte topper. Det var kun på DB5-15m-kolonne det ble brukt RTL. For å unngå at RTL skulle ha noen betydning, ble intervallet for RTL mot kalibrert RT satt til +/- 20

sekunder. Dette er et større intervall enn anbefalt, men satt på denne måten for å unngå å miste stoffer på grunn av for smalt vindu. Avlesningen med og uten RTL anses å ikke gi noen forskjell i stoff-funn og har antagelig ikke noen sammenheng med forskjellen på 18 %. En faktor som kanskje kan tas i betraktning er i hvilken grad kolonnene blir kontaminert av prøveinjeksjonene. Prøve-vials kan selv etter ekstrahering inneholde mye fett og stoffer som kan kontaminere kolonnene. Dette er noe som er vanskelig å kontrollere, og de to kolonnene kan ha forskjellig grad av selvrensing. Det ble injisert DCM mellom hver pasientprøve i et forsøk å unngå smitte og i tillegg rense kolonnene.

## 5.5 Kritiske faktorer

Det kan være flere faktorer som kan ha innvirkning når to metoder skal sammenlignes. En kritisk faktor ved sammenligningen av metodene er bruken av to identiske, men fysisk forskjellige instrumenter med hver sin kolonnetype. Skifte av kolonne på et GCMS instrument tar lang tid, derfor ble det valgt å bruke to instrumenter. For å unngå forskjeller under opparbeiding av prøvene, ble de samme vials injisert først på det ene instrumentet, deretter på det andre. Vials ble tilsatt DCM som fordamper lett, men det velges å se bort fra minimal inndamping i vials ved injeksjon fra et instrument til det andre når det skjer innen kort tid. Instrumentene hadde noen ulike parameterinnstillinger (trykk, temperatur) på grunn av forskjellig kolonne-lengde. Begge instrumentene ble optimalisert og forsøkt behandlet likt angående helt nye kolonner, rene ionekilder og tuningsjekk. En kontroll med ti forskjellige analytter i en høy nok konsentrasjon til å bli funnet på begge instrument, ble rutinemessig injisert for å sjekke instrument-forholdene.

En annen kritisk faktor er valget av FT-biblioteket med 725 RTL-stoffer i forhold til NIST05 og PMWTOX som har 200000 stoff-spektre. Utvalget av stoffer i det RT-låste biblioteket er lite i forhold, men inneholder allikevel de aller fleste viktige rus-og legemidler, nedbrytingsprodukter (metabolitter) og derivater. Disse er i tillegg RT-låst og kan brukes som ekstra kontroll på at rett stoff er funnet. I tillegg er det enkelt å legge nye stoffer inn i

biblioteket dersom det ønskes. Forskjellen på bibliotekene ble vurdert til å ha liten betydning for utfallet av undersøkelsen.

For å unngå "bias", merket en annen person prøvene 1-70 med andre nummer enn opprinnelig slik at den som utførte analysen var blindet og prøvene ikke kunne gjenkjennes ved reanalyse. Prøvene 1-70 var ikke eldre enn ett år gamle, dette for å unngå mulig holdbarhetsproblematikk (prøvene 71-167 var nye prøver som rutinemessig ble ekstrahert). Noen stoffer har likevel så kort holdbarhet at de kan bli brutt ned på kort tid. Et eksempel er 6-monoacetylmorfin (6-MAM), en metabolitt av heroin, som kan bli omdannet til morfin ved lagring. Denne nedbrytingen vil uansett ikke influere på det eksperimentelle da det ville gjelde for begge metoder.

Stoffene GHB, amfetamin og salicylsyre egner seg ikke så godt på GCMS på grunn av at de er polare og/eller har liten retensjon på stasjonærfasen på GC-kolonnen. Ved metoden MED DRS og DB5-15m kolonnen har disse to stoffene RT på henholdsvis 1.7 og 2.1 minutter. Separasjonen i kromatografien på GC-kolonnen er ikke bra i de 2-3 første minuttene, med utflytende brede topper. Fordi metoden bruker RTL vil dette være et kritisk punkt. Topper kan bli registrert med RT som avviker for mye i forhold til RTL-biblioteket, med den følge at stoffet ikke blir funnet. Den dårlige kromatografien kan skyldes at starttemperatur på kolonnen er 100 °C og høyere enn kokepunktet til løsemiddelet DCM (36 °C) som er i prøvevials. Ved GC-kapillærkolonner bør starttemperaturen være 5-10 grader lavere enn kokepunktet til løsemiddelet noe som altså ikke er tilfellet her. Stoffene vil vandre gjennom kolonnen med en hastighet som er bestemt av deres flyktighet, løselighet i stasjonærfase og temperatur i ovnen [2]. Amfetamin og salicylsyre kondenseres og fordampes for hurtig til å få god kromatografi. Kombinasjonene tidlig eluering (liten retensjon), lettflyktighet (MW på henholdsvis 138/136) og høy polaritet, gir dårlig kromatografi. Toppene er brede og usymmetriske, RT blir ikke korrekt i forhold til det RT-låste FT-biblioteket og blir følgelig ikke registrert som funn ved den automatiske DRS- rapporten. Ved ekstrahering av de spesifikke m/z for salicylsyresyre og amfetamin er deteksjonen bedre, ved den automatiske rapporten ble den gjenfunnet kun ved den høyeste konsentrasjonen (figur 24). Ved metoden

UTEN DRS er starttemperatur på kolonnen 50 °C og amfetamin med RT 7.54 og salicylsyre med RT 7.97 minutter, kan også her sees kun ved den høyeste konsentrasjon.

Paracetamol gir heller ingen god kromatografisk topp ved DRS, og dermed kan også noen positive paracetamol-prøver ”mistes” på grunn av låst retensjonstid. Paracetamol gir heller ingen god kromatografisk topp ved UTEN DRS, men blir likevel registrert ved ChemStation automatisk rapport da denne metoden ikke er RT-låst. Denne forskjellen sees i tabell 2 og 4 (for eksempel prøver nr. 52, 67, 68 og 148) ved prøver der paracetamol blir funnet i metoden UTEN DRS og ikke i metoden MED DRS. En begrensning ved DRS er bruken av toppmaksimering ved modell-topp-laging. Dersom to topper maksimerer på nøyaktig samme tid, vil bare et stoff-spekter bli dannet. Dessuten dersom topper er brede, og det er flere lokale maksima, kan stoffet bli identifisert flere ganger. Det må da en manuell vurdering til av hva er det beste treffet og hva skal kvantiteres.

## 5.6 Fremtidige forbedringer av metoden MED DRS

For å unngå flyktighetsproblematikken med polare stoffer med lav MW, som amfetamin, salicylsyre, GHB og paracetamol, kan det bli prøvd ut å tilsette sur beskyttelsesløsning til prøvene etter ekstraksjon før inndamping. Prinsippet er å få stoffene over på ladet form, for deretter å binde seg til Cl<sup>-</sup> i HCl og danne et salt som ikke er flyktig. Dette gjøres for å øke gjenfinning (recovery) av stoffet.

Ved injisering av prøver med ukjent innhold, kan kolonner og ionekilde fort bli kontaminert. Dette kan gi dårlig kromatografi og lav gjenfinning av stoffer. For å få en kontroll med hvordan forholdene er på kolonne og ionekilde, kan det tilsettes internstandard (IS) i prøveopparbeidelse. IS er et stoff som tilsettes i lik mengde i alle glass før prøveopparbeidelse, det og ratio prøve/IS vil være konstant. Gjenfinning av IS skal da ideelt sett være lik i alle prøver etter ekstraksjon. IS-tilsetning kan gjøres for å ha en kontroll med både ekstraksjon, injeksjon og gjenfinning av stoff. IS må være et stoff som ikke brukes som medisin eller kan bli funnet prøvene. Deuteriserte IS fungerer bra, men er kostbart. Stoffet må

i tillegg kunne ekstraheres både surt og basisk, eller det eventuelt brukes både en sur og en basisk IS. Grunnen til at IS ikke ble tatt med i denne oppgaven var for å utføre metodene mest mulig lik det som er gjort tidligere.

En måte å hindre mye avleiring av kontaminerende stoffer i kolonnene og MSD er ”backflushing”. Denne metodikken er omtalt i en artikkel fra Agilent [23]. Et ventilsystem montert på kolonnen før prøve går inn i MSD kombinert med temperatur/trykk program vil gjøre at tunge, kontaminerende stoffer vil reversere (backflush) mot slutten av analys tiden og hindre disse å komme inn i MSD. Dette kan redusere kontaminering av både MSD og kolonne, dessuten kan kolonneskift utføres uten nedventilering av MSD som gir en vesentlig tidsbesparing. ”Backflushing”-teknikken krever installasjon av turbopumper. Det kan være aktuelt å prøve ut denne teknikken.

Erfaringsmessig viser bruk av RTL-metoder at RT ikke holder seg stabil over lengre tid. Dersom RT varierer med mer enn +/-20 sekunder i forhold til den definerte RT i et bibliotek, blir stoffet ikke rapportert. Grunnen til at RT forandrer seg gjennom sekvensen selv om metoden har RTL, kan være tilgrising av kolonnen under injisering av prøvene eller ustabilitet ved instrumentet. Metodens robusthet blir styrket ved å låse RT på ny før hver sekvens eller med jevne mellomrom, og deretter kjøre en kontrollprøve for å teste RT. En slik kontrollprøve bør inneholde stoffer som er varierende i RT, elueringshastighet, pKa og logP.

Det må tilstrebes å unngå hyppig kolonne-kutting. Metoden kjører med konstant trykk som i utgangspunktet skal være 4.7 psi og ved kutting av kolonne blir trykket regulert ned. Ved gjentatte kuttinger vil trykket kunne bli så lavt at instrumentet ikke klarer å lage ny kalibreringskurve. I stedet for kutting av kolonnen kan en opprenksing av kolonnen med gjentatte injeksjoner av et egnet løsemiddel være bedre. For å unngå dårlig kromatografi av stoffer som har liten retensjon (kort RT), kan det tilsettes et løsemiddel med høyere kokepunkt enn DCM i vials. Et løsemiddel som har høyere kokepunkt enn DCM (bp.38 °C) kan kanskje forbedre kromatografien og øke retensjonen av de tidligst eluerende stoffene.

Det vil i tillegg være nødvendig å injisere flere stoffer i forskjellige konsentrasjoner for å finne mer nøyaktige deteksjonsgrenser. Dette blir et deteksjon/recovery-forsøk på tilsvarende måte som i deteksjonsforsøket vist i figur 24 og vedlegg 6. På denne måten kan en samle seg erfaringer med estimerte konsentrasjoner ved stoff-funn bare ved en enkel scan-injeksjon.



## 6. Konklusjon

- 1) Ved bruk av metode med deconvolution, FT-DBL-RTL og 15 m DB5- kolonne (ny metode) ble det registrert 40 % flere funn enn ved bruk av metode uten deconvolution på en 30 m HP5- kolonne (gammel metode).
- 2) Ved bruk av metode med deconvolution både på 15 m DB5- og på 30 m HP5-kolonne, ble det registrert 18 % flere funn med 15 m DB5-kolonne sammenlignet med 30 m HP5- kolonne. Ved bruk av metode uten deconvolution på 15 m DB5- og på 30 m HP5-kolonne, ble det ikke funnet forskjell i antall registrerte analytter.
- 3) Ved ny metode med deconvolution, FT-DBL-RTL og 15 meters DB5-kolonne ble kjøretid på instrumentet nesten halvert, og den totale analysetiden (instrumenttid og rapportering) ble redusert med 60 % i forhold til gammel metode uten deconvolution og 30 m HP5-kolonne.

## 7. Referanser

1. Wikipedia.org, *Gas chromatography-mass spectrometry*.
2. Greibrokk, T., Lundanes E., Rasmussen, K.E., *Kromatografi, Separasjon og Deteksjon*. 1994: Universitetsforlaget. 30.
3. Hardy, J.K., The University of Akron, *Chemical separations*. Lecture slides, 2005.
4. CUBoulder Organic Chemistry Undergraduate Courses, L.t. *Gas Chromatography*. Available from: <http://orgchem.colorado.edu/hndbksupport/GC/GC.html>.
5. Resonance Publications, I. *Chromatography, Concepts and Definitions, Indexes of Column Efficiency & Chromatographic Separation*. Available from: <http://www.resonancepub.com/chromtutorial.htm>.
6. Agilent, A.T., *Life sciences/Chemical Analysis, Capillary GC Columns*. 2000-2009.
7. Wikipedia.org. *Mass spectrometry*. Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry).
8. Gates, P., School of Chemistry, NERC Life Sciences Mass Spectrometry Facility (LSMSF), University of Bristol, , *Gas Chromatography Mass Spectrometry (GCMS)*.
9. Tissue, B.M., The Chemistry Hypermedia Project at Virginia Tech. *Analytical Extractions Quadrupole Mass Spectrometry*. 2000; Available from: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/extract/extract.html>  
<http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/ms/quadrupo.html>.
10. Murray, K.K., Wikipedia. *Schematic representation of a tandem mass spectrometry experiment*. 13 May 2006; Available from: [http://en.wikipedia.org/wiki/Tandem\\_mass\\_spectrometry](http://en.wikipedia.org/wiki/Tandem_mass_spectrometry).
11. Gross, J.H., *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2004, Berlin: Springer. 104.
12. HAMAMATSU. *Ion detectors for mass spectroscopy, Technical information*. 2000; Available from: [http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/Ion\\_Detector\\_Tec\\_Info\\_E.pdf](http://sales.hamamatsu.com/assets/applications/SSD/Ion_Detector_Tec_Info_E.pdf).
13. Anthonen, H.S. (2003) *Ionparmediert væskefase mikroekstraksjon. Evaluering av ny metode for ekstraksjon av hydrofile legemidler*.
14. Agilent G1674AA, A.T., *Deconvoluting Reporting Software (DRS) Solution for Forensic Toxicology*. 2008.
15. Agilent , T. *Deconvolution Reporting Software (DRS), An add-on to the MSD Productivity ChemStation*. Available from: <http://www.chem.agilent.com/en-US/Products/Instruments/ms/Pages/gp14509.aspx#decon>.
16. Mallard, G., OPCW laboratory, NIST, *Chemical Weapons, AMDIS and Chemical Identifications*. p. 74.
17. Stein, S.E., *An integrated Method for Spectrum Extraction and Compound Identification from GC/MS Data*. p. 30.
18. D'Arcy, P., Mallard, G., OPCW laboratory, NIST, *AMDIS-USER GUIDE*. p. 144.
19. Sandy, C., The Agilent G1716AA, *Deconvoluting Reporting Software (DRS)- Principle and Practice*.
20. Agilent , T., *Probe Selection with respect to the 5% phenyl ultra Inert Column Offered by Agilent Technologies, Technical Overview..* 2008.
21. ChemSpider, R., *Advancing the chemical Sciences, Building community for chemists*. 2008.

22. National Toxicology Program, D.o.H.a.H.S. *Testing Status of Agents at NTP*. 2009; Available from: <<http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=E882CDD6-BDB5-82F8-FA166BFA96D0AB53>>
23. Quimby, B., Agilent Technologies, Wilmington, USA, *Improved Forensic Toxicology Screening Using A GC/MS/NPD System with a 725-compound DRS Database*. 2008.
24. Wylie, P.L., Szelewski M.J., Meng, C.K., Sandy, C.P., Agilent Technologies *Comprehensive Pesticide Screening by GC/MSD using Deconvoluting Reporting Software, application 5989-1157EN*. 2004.

## Vedlegg

Vedlegg 1: Instrument-innstillinger på GCMS .....	77
Vedlegg 2: Parameter-innstillinger og konfigurering .....	79
Vedlegg 3: Rapportutskrift fra ChemStation biblioteksøk .....	80
Vedlegg 4: Manuelt fratrekk av bakgrunnsspekter .....	81
Vedlegg 5: Strukturer på stoffer brukt i deteksjons/recovery-forsøk.....	82
Vedlegg 6: Deteksjonsgrenser.....	83
Vedlegg 7: Sammenligning av recovery MED/UTEN DRS .....	89
Vedlegg 9: Skjulte topper i deteksjonsforsøk .....	92
Vedlegg 10: Utregning av kromatografisk oppløsning.....	94

# Vedlegg 1: Instrument-innstillinger på GCMS

**Tabell 8.** Instrumentinnstillinger på begge GCMS-instrumenter, UTEN DRS og HP5-30m til venstre, MED DRS DB5-15m til høyre.

## UTEN DRS, HP5-30m

GC Agilent Technologies 6890	
Inlet	EPC split/splitless
Mode	Konstant flow
Inj.type	Splitless
Inj.volum µL	1,0
Inlet temp.(°C)	250
Trykk, nominal(psig)	7,64
RT locking Compound	-
RT locking time(min)	-
Purge Flow (mL/min)	50
Purge Time	2
Gass type	Helium
Kolonne	
Type	HP5-MS
Agilent part.nr.	19091S-433
Lengde (m)	30
Diameter (m m)	0,25
Film tykkelse (µm)	0,25
Nominal Initial Flow (ml/min)	1,0
Outlet pressure	Vakuum
Oven	
Volt (VAC)	240
Initial oven temp (min)	50
Initial oven hold (min)	2
Ramp Rate (°C)	20
Final Temp. (°C)	300
Final Hold. (min)	10
Total Run time (min)	24,5
Equilibration time (min)	0,5

## MED DRS, DB5-15m.

GC Agilent Technologies 6890	
Inlet	EPC split/splitless
Mode	Konstant trykk
Inj.type	Splitless
Inj.volum µL	1,0
Inlet temp.(°C)	280
Trykk, nominal(psig)	4,7
RT locking Compound	Venlafaxin
RT locking time(min)	8,5
Purge Flow (mL/min)	50
Purge Time	0,75
Gass type	Helium
Kolonne	
Type	DB5-MS
Agilent part.nr.	122-5512
Lengde (m)	15
Diameter (m m)	0,25
Film tykkelse (µm)	0,25
Nominal Initial Flow (ml/min)	1,0
Outlet pressure	Vakuum
Oven	
Volt (VAC)	240
Initial oven temp (min)	100
Initial oven hold (min)	0,5
Ramp Rate (°C)	20
Final Temp. (°C)	325
Final Hold. (min)	2,5
Total Run time (min)	14,25
Equilibration time (min)	0,5

MSD Agilent Technologies 5975	
Pumpetyper	Edwards G1099-80024 + Diffusion
Tune file	S-tune
Mode	Scan
Solvent delay (min)	3
EM Voltage	Stune Voltage
Low mass (amu)	40
High mass (amu)	570
Threshold **	150
Trace Ion Detection (TID)	
Sampling	2
Quad.temp. (°C)	150
Source temp. (°C)	230
Transfer line temp.(°C) AUX	280

MSD Agilent Technologies 5975	
Pumpetyper	Edwards G1099-80024 + Diffusion
Tune file	Atune U.
Mode	Scan
Solvent delay (min)	1,4
EM Voltage	Atune voltage
Low mass (amu)	40
High mass (amu)	570
Threshold	0
TID	On
Sampling	2
Quad.temp. (°C)	150
Source temp. (°C)	300
Transfer line temp.(°C) AUX	300

Kilde: Agilent Technologies, Agilent G1674AA, Deconvolution Reporting Software(DRS)

### Diverse forklaringer til instrumentinnstillinger:

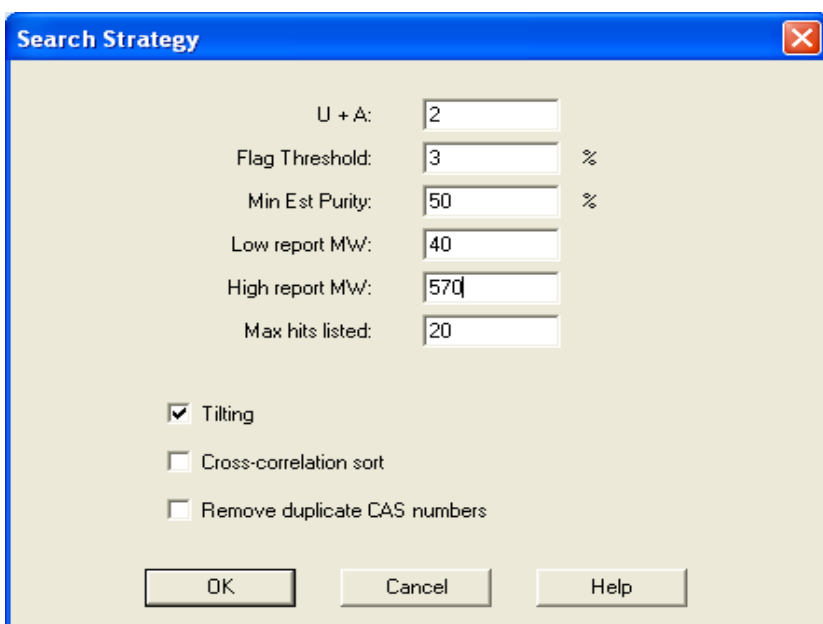
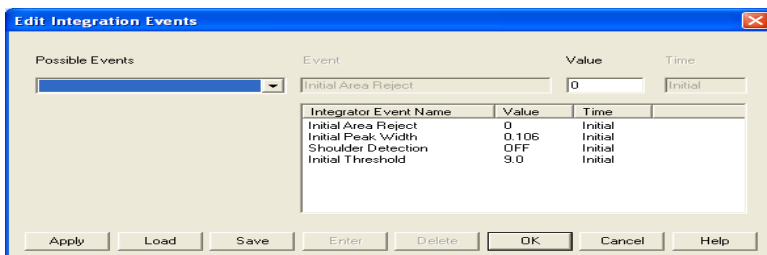
Kilde: Agilent Technologies, Agilent G1674AA, Deconvolution Reporting Software(DRS) solution for Forensic Toxicology

\*\*Threshold: Bare ioner med respons (abundance) likt eller større enn denne verdien blir registrert (vanlig med 500). (forskjellige typer threshold)

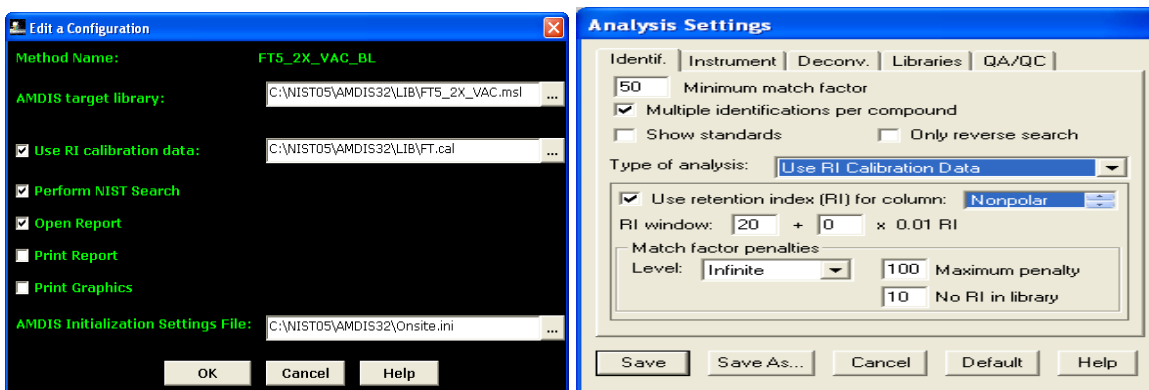
Sampling: Verdien her er brukt til å kalkulere antall ganger respons(abundansen) på hver masse blir sjekket. En verdi på 2 er passende for de fleste analyser. Resultatet er rapportert i Samples og blir kalkulert som  $2^N$ . Den anbefalte verdien er 2 (som gir 4 som antall ganger sjekking blir gjort). Området er fra 0-7.

TID, Trace Ion Detection: en digital støyfiltrering fra basislinje, topper og spektra for å forbedre deteksjon med og uten DRS. Med TID og DRS metodedeteksjonsgrenser og LOQ er lavere. Falske positive/negative er redusert.

## Vedlegg 2: Parameter-innstillinger og konfigurering



**Figur 31.** Figuren viser Chemstation-innstillinger, øverst integreringsparameter, nederst søkeparameter-innstillinger.



**Figur 32.** Figuren viser konfigureringsbilde for DRS til venstre og instrumentinnstillinger i AMDIS til høyre.

# Vedlegg 3: Rapportutskrift fra ChemStation

## biblioteksøk

Library Search Report

Data Path : D:\Data09\04014GB2\  
 Data File : 0401006.D  
 Acq On : 2 Apr 2009 17:12  
 Operator : GB  
 Sample : RM basisk 030/09  
 Misc :  
 ALS Vial : 4 Sample Multiplier: 1

Search Libraries: C:\Database\NIST05.L Minimum Quality: 0

Unknown Spectrum: Apex minus start of peak  
 Integration Events: Chemstation Integrator - events.e

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
1	3.522	0.00	C:\Database\NIST05.L			
			Decanoic acid, 3-methyl-	47224	060308-82-9	9
			Allyl dithioisobutyrate	29780	063881-54-9	7
2	3.614	0.00	C:\Database\NIST05.L			
			Ethene, methoxy-	221	000107-25-5	9
			1,2-Hydrazinedicarboxaldehyde	1913	000628-36-4	9
3	3.705	0.01	C:\Database\NIST05.L			
			2-Propanamine, N-methyl-	745	004747-21-1	9
			1-Propanone, 1-(1-adamantyl)-3-dimethylamino-	81802	031878-58-7	9
4	3.797	0.01	C:\Database\NIST05.L			
			4-Heptanone, 2-methyl-	12147	000626-33-5	38
			Oxalic acid, 6-ethyloct-3-yl isobutyl ester	115947	1000309-34-1	35
			Hexyl octyl ether	67336	017071-54-4	35

**Figur 34.** Eksempel på forkortet rapport fra automatisk ChemStations automatiske-bibliotek-søk:

Utsnitt fra rapport fra Chemstation-PBM-søk. Forklaring til rapport:

Pk# : Nummerering på integrerte toppe i kromatogrammet. Antallet kommer an på threshold-setting.

RT.: Retensjonstid til aktuelle topp

Library/ID: Navn på stoff funnet i aktuelle bibliotek

Ref# / CAS#: Nummer på aktuelt stoff i forskjellig kjemiske oppslagsverk. CAS(Cheical Abstracts Service)-nr. er spesifikt.

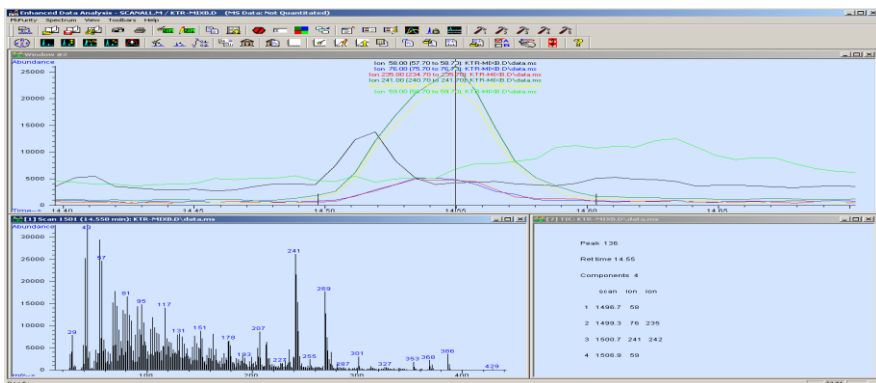
Qual: Quality, prosent-treff, på aktuelt stoff mot bibliotek.



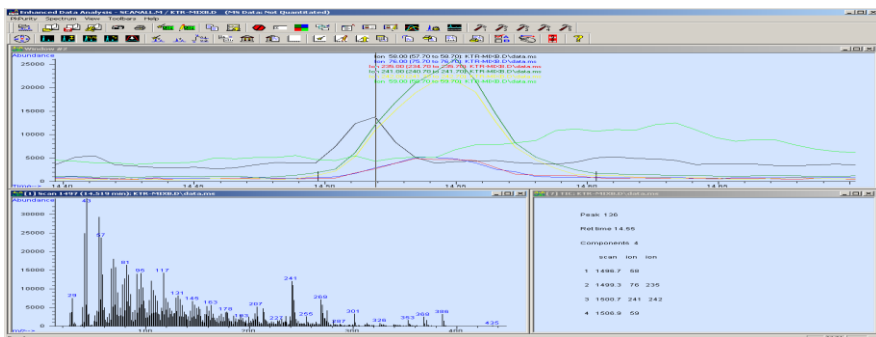
## Vedlegg 4: Manuelt fratrekk av bakgrunnsspekter

Usikre treff ved avlesning på metode UTEN DRS i ChemStation ble sjekket med manuelt søk med fratrekk av bakgrunnsspekter. Eksempel på spekter med bakgrunn som trekkes fra:

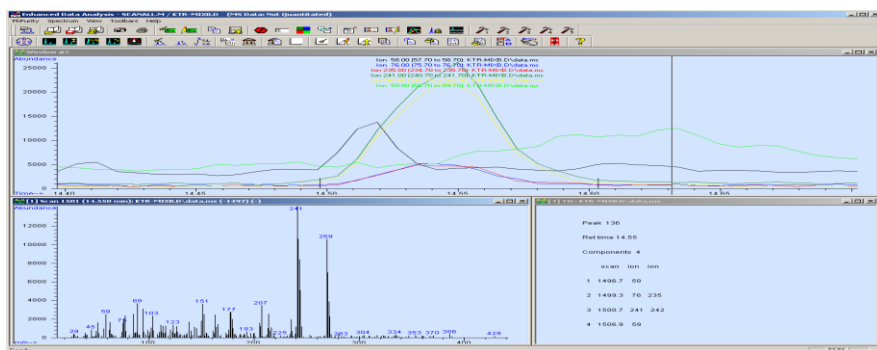
a) Curser klikkes på hovedtopp, spekter vises nederst til venstre.



b) Bakgrunn trekkes fra, bakgrunnsspekter nederst til venstre.

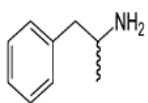


c) Differensen viser et renere spekter nederst til venstre.

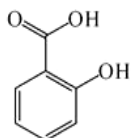


**Figur 35.** Figur viser manuelt fratrekk av bakgrunnsspekter ved avlesning i ChemStation. a) Klikk på ønsket topp, b) bakgrunnsspekter trekkes fra og c) det er blitt et renere spekter.

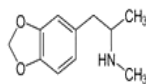
## Vedlegg 5: Strukturer på stoffer brukt i deteksjons/recovery-forsøk



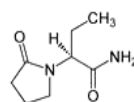
Amfetamin, MW 135 g/mol



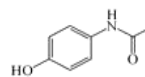
Salicylsyre, MW 138 g/mol



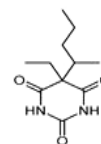
MDMA, MW 193 g/mol



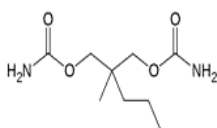
Levetiracetam, MW 170 g/mol



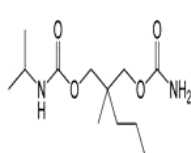
Paracet, MW 151 g/mol



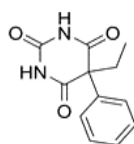
Pentobarbital, MW 226 g/mol



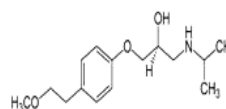
Meprobamat, MW 218 g/mol



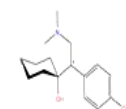
Carisoprodol, MW 260 g/mol



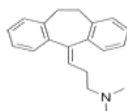
Fenobarbital, MW 232 g/mol



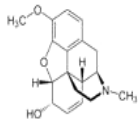
Metoprolol, MW 267 g/mol



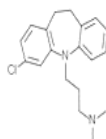
Venlafaxin, MW 277 g/mol



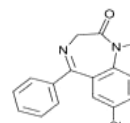
Amitriptylin, MW 277,4 g/mol



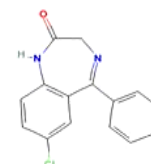
Kodein, MW 299 g/mol



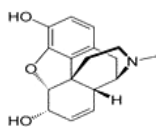
Klomipramin, MW 315 g/mol



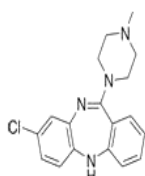
Diazepam, MW 284 g/mol



DMD MW, 270,7 g/mol



Morfin, MW 285 g/mol



Klozapin, MW 326,8 g/mol

## Vedlegg 6: Deteksjonsgrenser

**Tabell 9.** Deteksjonsforsøk, metode UTEN DRS- basisk ekstraksjon, HP5-30m

Stoff	Ion / RT	10 nM	50 nM	100 nM	250 nM	500 nM	750 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	50000 nM
Amfetamin	44 / 7,67										X
Salicylsyre	120 / 7,97										
MDMA	58 / 10,36									X	X
Levetiracetam	126 / 10,65								X	X	X
Paracetamol	109 / 11,55										X
Pentobarbital	156 / 11,79						X	X	X	X	X
Meprobamat	83 / 12,00					X	X	X	X	X	X
Carisoprodol	158 / 12,42								X	X	X
Phenobarb	204 / 13,09										X
Metoprolol	72 / 13,27										X
Venlafaxin	58 / 13,56									X	X
Amitriptylin	58 / 14,03						X	X	X	X	X
Kodein	299 / 15,03							Skjult	X	Skjult	Skjult
Klomipramin	58 / 15,06							X	X	X	X
Diazepam	256 / 15,23				Skjult	Skjult	Skjult	Skjult	X	X	X
Morfin	285 / 15,28										
Desmetyldiazepam	242 / 15,68				X	X	X	X	X	X	X
Klozapin	243 / 18,14						X	X	X	X	X

**Tabell 10.** Deteksjonsforsøk, metode UTEN DRS - sur ekstraksjon, HP5-30m.

Stoff	Ion / RT	10 nM	50 nM	100 nM	250 nM	500 nM	750 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	50000 nM
Amfetamin	44 / 7,67										
Salicylsyre	120 / 7,97										X
MDMA	58 / 10,36										
Levetiracetam	126 / 10,65					X	X	X	X	X	X
Paracetamol	109 / 11,55								X	X	X
Pentobarbital	156 / 11,79				X	X	X	X	X	X	X
Meprobamat	83 / 12,00					X	X	X	X	X	X
Carisoprodol	158 / 12,42								X	X	X
Phenobarb	204 / 13,09			X	X	X	X	X	X	X	X
Metoprolol	72 / 13,27										
Venlafaxin	58 / 13,56									X	X
Amitriptylin	58 / 14,03					X	X	X	X	X	X
Kodein	299 / 15,03								Skjult	Skjult	Skjult
Klomipramin	58 / 15,06					X	X	X	X	X	X
Diazepam	256 / 15,23		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Morfin	285 / 15,28										
Desmetyldiazepam	242 / 15,68			X	X	X	X	X	X	X	X
Klozapin	243 / 18,14				X	X	X	X	X	X	X

**Tabell 11.** Direkteinjeksjoner metode UTEN DRS, HP5-30m. Oppkonsentrert 10ggr ved ekstraksjon, derfor injiseres 10x sterkere løsning.

Stoff	Ion / RT	100 nM	500 nM	1000 nM	2500 nM	5000 nM	7500 nM	10000 nM	50000 nM	100000 M	**
Amfetamin	44 / 7,67										
Salicylsyre	120 / 7,97										
MDMA	58 / 10,36								X	X	
Levetiracetam	126 / 10,65				X	X	X	X	X	X	
Paracetamol	109 / 11,55							X	X	X	
Pentobarbital	156 / 11,79				X	X	X	X	X	X	
Meprobamat	83 / 12,00					X	X	X	X	X	
Carisoprodol	158 / 12,42					X	X	X	X	X	
Phenobarb	204 / 13,09				X	X	X	X	X	X	
Metoprolol	72 / 13,27								(X)	X	
Venlafaxin	58 / 13,56				X	X	X	X	X	X	
Amitriptylin	58 / 14,03				X	X	X	X	X	X	
Kodein	299 / 15,03	Skjult	Skjult	Skjult	Skjult	Skjult	Skjult	Skjult	X	X	
Klomipramin	58 / 15,06			X	X	X	X	X	X	X	
Diazepam	256 / 15,23		X	X	X	X	X	X	X	X	
Morfin	285 / 15,28						?	X		X	
Desmetyldiazepam	242 / 15,68			X	X	X	X	X	X	X	
Klozapin	243 / 18,14			X	X	X	X	X	X	X	

\*\*Stockløsning (utgangsløsning) er 100uM (100.000nM), derfor er det ikke noen 500.000nM-kons.

**Tabell 12.** Metode MED DRS, basisk ekstraksjon, DB5-15m.

Stoff	Ion / RT	10 nM	50 nM	100 nM	250 nM	500 nM	750 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	50000 nM
Amfetamin	44 / 1,91										X
Salicylsyre	120 / 2,12										
MDMA	58 / 4,29									X	X
Levetiracetam	126 / 4,44			X	X	X	X	X	X	X	X
Paracetamol	109 / 5,17							X	X	X	X
Pentobarbital	156 / 5,65		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Meprobamat	83 / 5,87				X	X	X	X	X	X	X
Carisoprodol	158 / 6,29				X	X	X	X	X	X	X
Phenobarb	204 / 6,98								X	X	X
Metoprolol	72 / 7,24								X	X	X
Venlafaxin	58 / 7,42			X	X	X	X	X	X	X	X
Amitriptylin	58 / 7,98				X	X	X	X	X	X	X
Kodein	299 / 8,96		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klomipramin	58 / 9,02		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diazepam	256 / 9,18			X	X	X	X	X	X	X	X
Morfin	285 / 9,30										X
Desmetyldiazepam	242 / 9,57	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klozapin	243 / 11,04			X	X	X	X	X	X	X	X

**Tabell 13.** Metode MED DRS, sur ekstraksjon, DB5-15m kolonne.

Stoff	Ion / RT	10 nM	50 nM	100 nM	250 nM	500 nM	750 nM	1000 nM	5000 nM	10000 nM	50000 nM
Amfetamin	44 / 1,91										
Salicylsyre	120 / 2,12										X
MDMA	58 / 4,29										
Levetiracetam	126 / 4,44		X	?	X	X	X	X	X	X	X
Paracetamol	109 / 5,17					X	X	X	X	X	X
Pentobarbital	156 / 5,65		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Meprobamat	83 / 5,87				X	X	X	X	X	X	X
Carisoprodol	158 / 6,29				X	X	X	X	X	X	X
Phenobarb	204 / 6,98		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metoprolol	72 / 7,24										
Venlafaxin	58 / 7,42					X	X	X	X	X	X
Amitriptylin	58 / 7,98		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kodein	299 / 8,96				X	X	X	X	X	X	X
Klomipramin	58 / 9,02		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Diazepam	256 / 9,18		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Morfin	285 / 9,30										
Desmetyldiazepam	242 / 9,57	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Klozapin	243/ 11,04		X	X	X	X	X	X	X	X	X

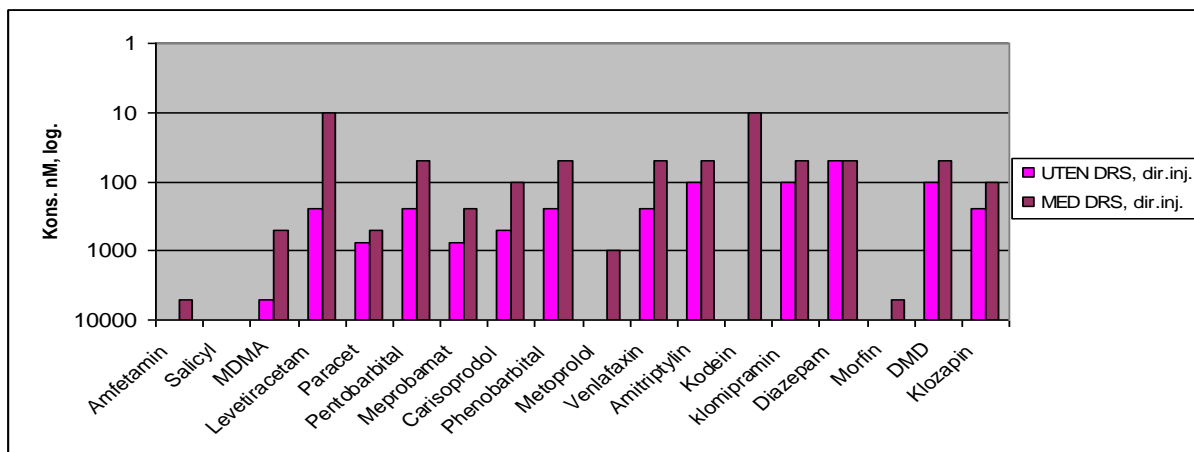
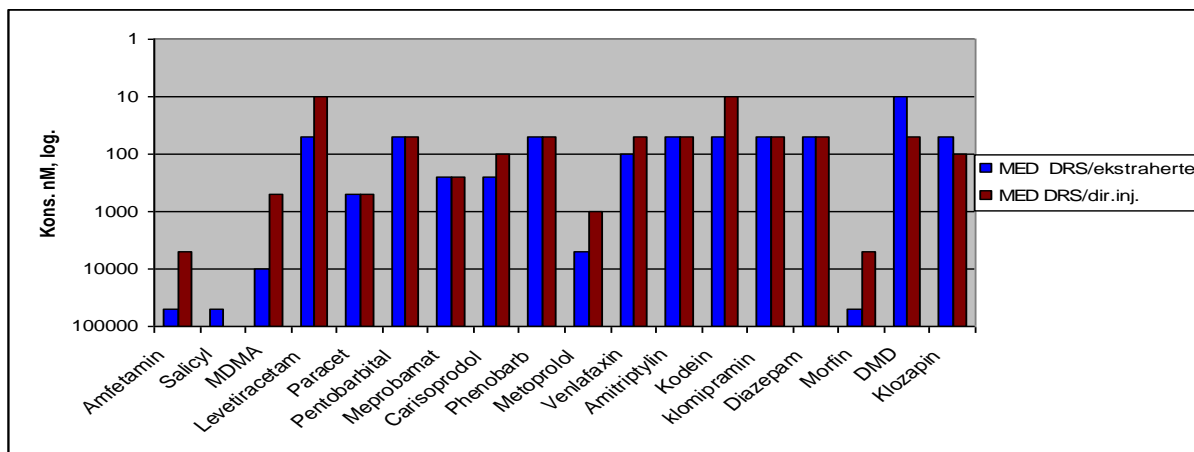
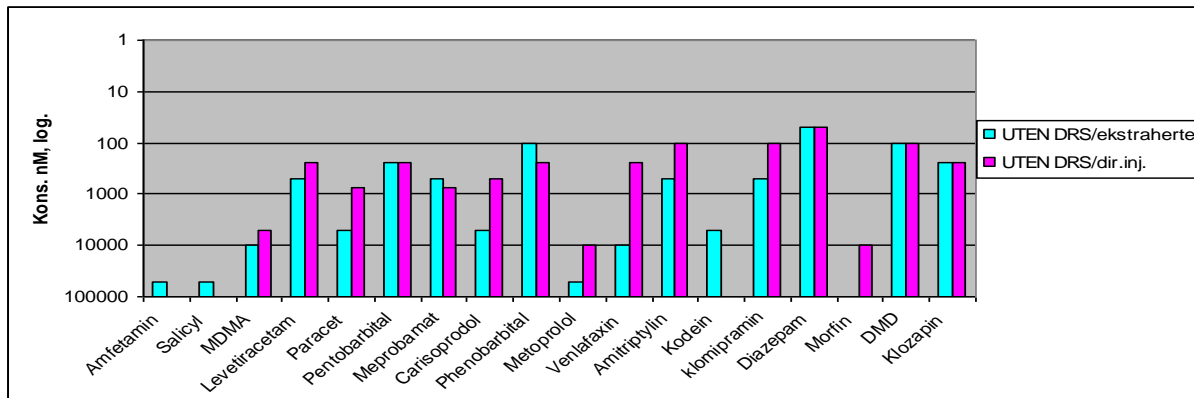
**Tabell 14.** Direkte injeksjoner metode MED DRS, DB5-15m. Oppkonsentrert 10ggr ved ekstraksjon, derfor injiseres 10x sterkere løsning.

Stoff	Ion / RT	100 nM	500 nM	1000 nM	2500 nM	5000 nM	7500 nM	10000 nM	50000 nM	100000 M	**
Amfetamin	44 / 1,91								X	X	
Salicylsyre	120 / 2,12										
MDMA	58 / 4,29					X	X	X	X	X	
Levetiracetam	126 / 4,44	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Paracetamol	109 / 5,17				X	X	X	X	X	X	
Pentobarbital	156 / 5,65		X	X	X	X	X	X	X	X	
Meprobamat	83 / 5,87				X	X	X	X	X	X	
Carisoprodol	158 / 6,29			X	X	X	X	X	X	X	
Phenobarb	204 / 6,98		X	X	X	X	X	X	X	X	
Metoprolol	72 / 7,24							X	X	X	
Venlafaxin	58 / 7,42		X	X	X	X	X	X	X	X	
Amitriptylin	58 / 7,98		X	X	X	X	X	X	X	X	
Kodein	299 / 8,96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Klomipramin	58 / 9,02		X	X	X	X	X	X	X	X	
Diazepam	256 / 9,18		X	X	X	X	X	?	X	X	
Morfin	285 / 9,30								X	X	
Desmetyldiazepam	242 / 9,57		X	X	X	X	X	X	X	X	
Klozapin	243/ 11,04			X	X	X	X	X	X	X	

\*\* Stockløsning (utgangsløsning) er 100uM (100.000nM), derfor er det ikke noen 500.000nM-kons.



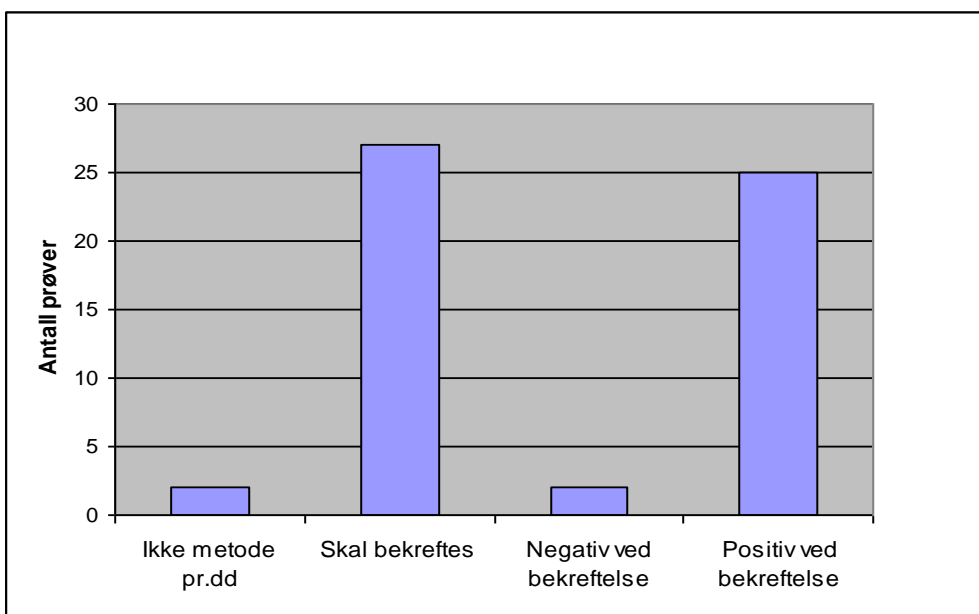
# Vedlegg 7: Sammenligning av recovery MED/UTEN DRS



**Figur 36.** Figuren viser histogram over recovery-resultat. Ekstraherte prøver blir sammenlignet mot direkteinjeksjoner, øverst UTEN DRS, midterste MED DRS for å finne hvilken betydning ekstraksjon har for recovery. Nederst blir direkteinjeksjoner fra UTEN DRS og MED DRS sammenlignet, og dette histogrammet bekrefter at MED DRS har bedre deteksjon enn UTEN DRS.

## Vedlegg 8: Bekreftelse av prøver 1-70

Prøver 1-70 var analysert tidligere, da delvis med DRS i en prøveperiode, men ikke på noen optimalisert metode. Det eksisterte derfor resultat-data på disse prøvene fra før. Ved sammenlikning med nye resultat fra både MED DRS og UTEN DRS og prøveperiode-resultat ble det funnet 29 stoffer som kun er funnet på den nye DRS-metoden. Disse funnene ble bekreftet ved analyse av vial på LCMS på de respektive SIM-metoder sammen med standarder som ble ekstrahert i rutinen. Treffene varierte fra 50-92 %. To funn på DRS-metode ble ikke funnet på SIM-metode på LCMS. Det var flecainid og PCP. Flecainid var et funn på flecainid artifakt på scan og var usikker også på grunn av RT som var svært avvikende fra RT i kalibreringstabell. Treffet var også lavt, 51 %. PCP på LCMS viste en stor topp i spekter på target-ion, men ingen quilifier (kontrollion). Treffet på scan var også lavt, 53 %. To stoffer som ble funnet, eksisterte det ikke SIM-metoder på (klorcyclidin, temazepam). Se histogram over bekreftelse figur 38 og tabell 15.



**Figur 38.** Resultat av bekreftelse av 29 stoffer som ble funnet kun på metoden MED DRS. Vials fra GCMS-analysen ble injisert på LCMS-SIM-metode for hvert enkelt stoff sammen med tilhørende standard. Av 29 forskjellige stoffer ble 25 bekreftet positiv, to eksisterte det ikke metode på og to ble bekreftet negativ. Disse to siste var i utgangspunktet tvilsom med lavt prosenttreff (51-og 54 %) og avvikende RT.

**Tabell 15.** Prøver til bekreftelse av funn i prøver 1-70. Bekreftet funn IKKE bekreftet funn Ikke metode pr-dd.

Stoff-funn	Prøvenr
Klorprotixen	9
Oxycodon	11
Klorfeniramin	12
Warfarin	13 og 41
Levetiracetam	14
Citalopram	15 og 51
Venlafaxin	17, 24 og 59
Lidokain	18
Klorcyclizin	23
Alprazolam	30
Amitriptylin	53
Klomipramin	53
Metoklopramid	34
Oxarbamazepin	36

Bekreftet negativ	2
Mangler metode	2
Tot.antall	29

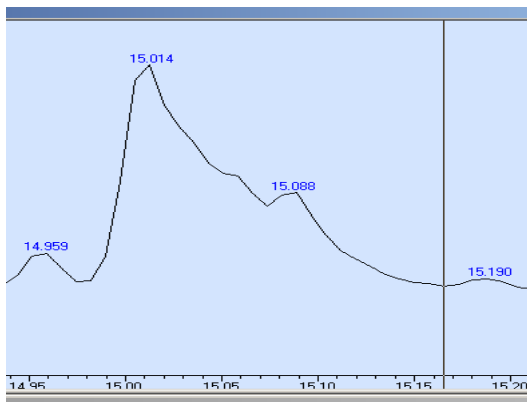
Stoff-funn	Prøvenr
Flecainid	45
Phencyclidin	49
Propoxyphen	50
Olanzapin	50
Zolpidem	50
Temazepam	50
Klozapin	53
Midazolam	60
Zopiklon	62
Alimemazin	68
Ibuprofen	58
Bekreftet positiv	25

- Klorcyclizin og temazepam finnes det ikke metoder på pr. i dag.
- Angående negativ bekreftelse av flekainid: Treff på 51% ved DRS, men RT-treff var -18 sekunder. Dette tyder på at det ikke er riktig stoff.
- Angående negativ bekreftelse av PCP: 51% treff på PCP-artifakt ved DRS, altså ikke ren PCP. Men på LCMS er det høyt utslag på ion 244, men ikke på kvalifier.

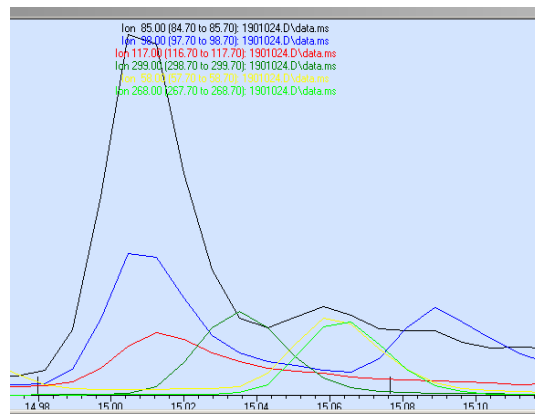
## Vedlegg 9: Skjulte topper i deteksjonsforsøk

Vedlegget viser et eksempel fra deteksjonsforsøket i kap.4.1 hvor kodein og klomipramin ikke er separert ved metoden UTEN DRS og HP5-30m-kolonne, se vedlegg 5A.

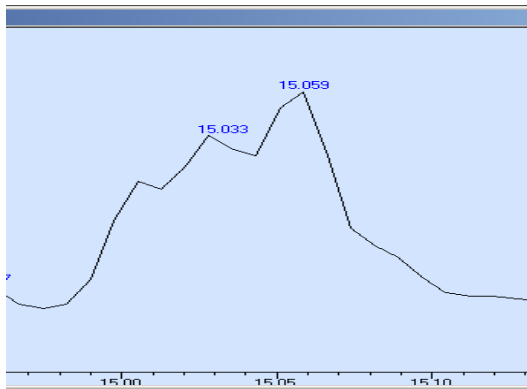
Oktanamid(naturlig nedbrytingsstoff, matrikseffekt) har RT 15.014, kodein har RT 15.033 og klomipramin har RT 15.06.



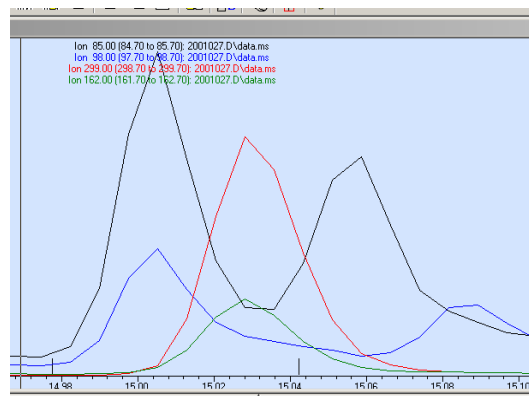
1) TIC st.1.000nM basisk UTEN DRS



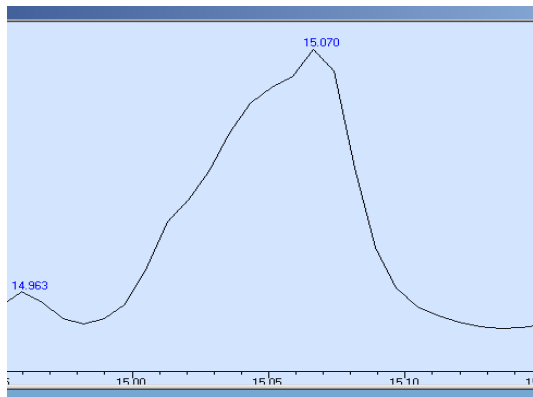
Ekstraherte topper 1)



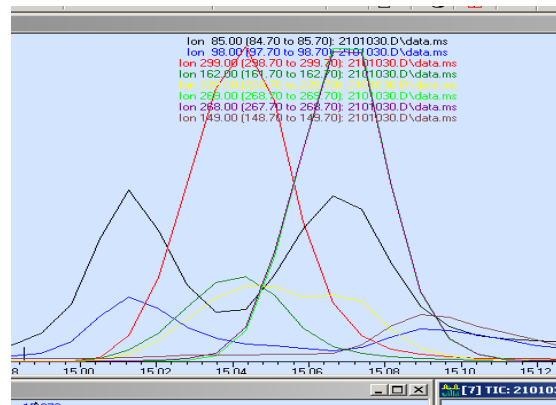
2) TIC st.5.000nM basisk UTEN DRS



Ekstraherte topper fra 2)



3) TIC st.10.000nM basisk UTEN DRS



Ekstraherte topper fra 3)

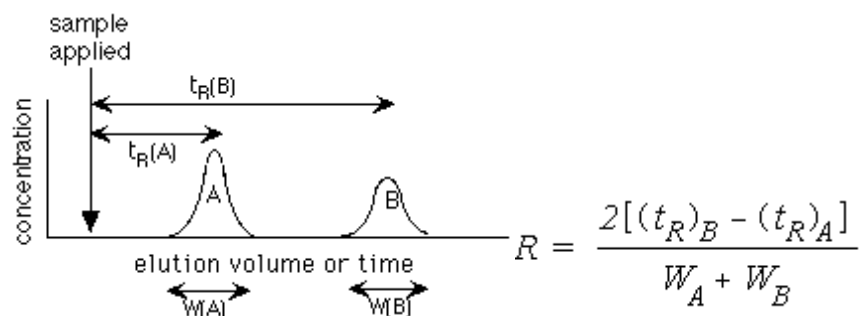
**Figur 37.** Figurene viser kromatogram av kodein og klomipramintopper fra tre forskjellige konsentrasjoner av ekstraherte kontrollprøver fra deteksjonsforsøk UTEN DRS. Av figur a) sees at kodein ikke blir integrert og er skjult under oktanamid /klomipramin-topper ved 1000-og 10.000 nM, men blir integrert ved 5000nM. Klomipramin blir integrert ved rette tid ved alle konsentrasjoner. Figuren over viser hvordan matriks effekten og samtidig eluerende stoffer forstyrrer integrering av topper og spektertreffet når metoden UTEN DRS brukes. Ved metoden MED DRS er ikke dette noe problem. Deconvolutin vil løse opp toppene og gi korrekt svar.

## Vedlegg 10: Utregning av kromatografisk oppløsning

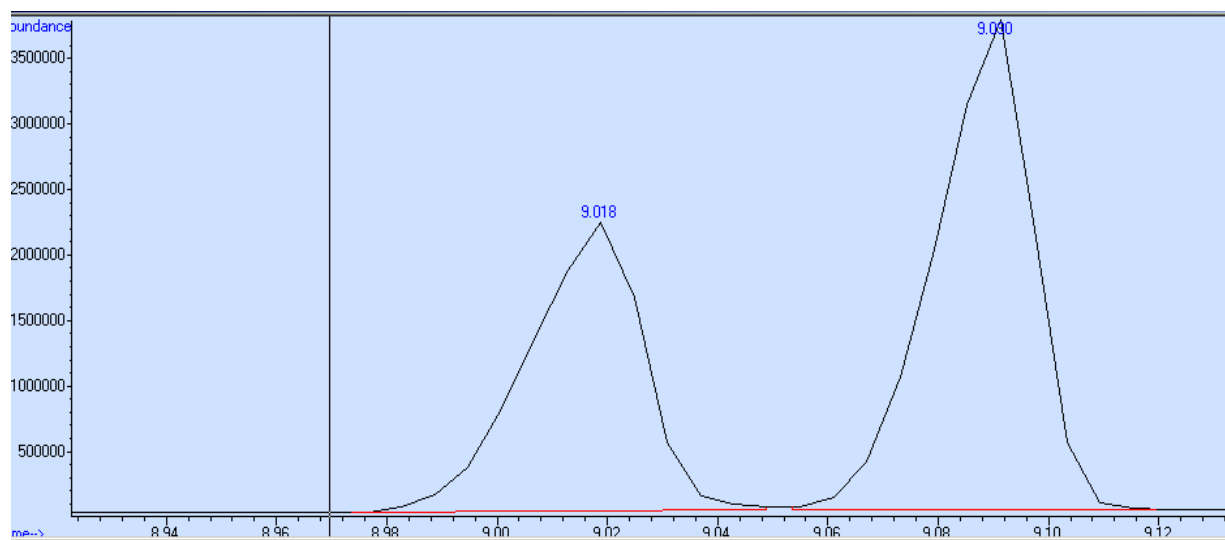
Utregning av kromatografisk oppløsning (resolusjon):

Til utregning av resolusjon på kolonner brukes to kromatogram analysert på samme standard både kolonne DB5-15m og HP5-30m.

Resolusjonsteori er fra kap.1.3.3.



Ved DB5-15m er RT 9.018 (kodein) og RT 9.090 (klomipramin).



**Figur 39.** Kromatogram fra kolonne DB5-15m som viser toppene kodein RT 9,018 og klomipramin RT 9,09

DB5-15m kolonne:

RT på de to toppene:  $(t_R)_B = 9.090$  og

$(t_R)_A = 9.018$

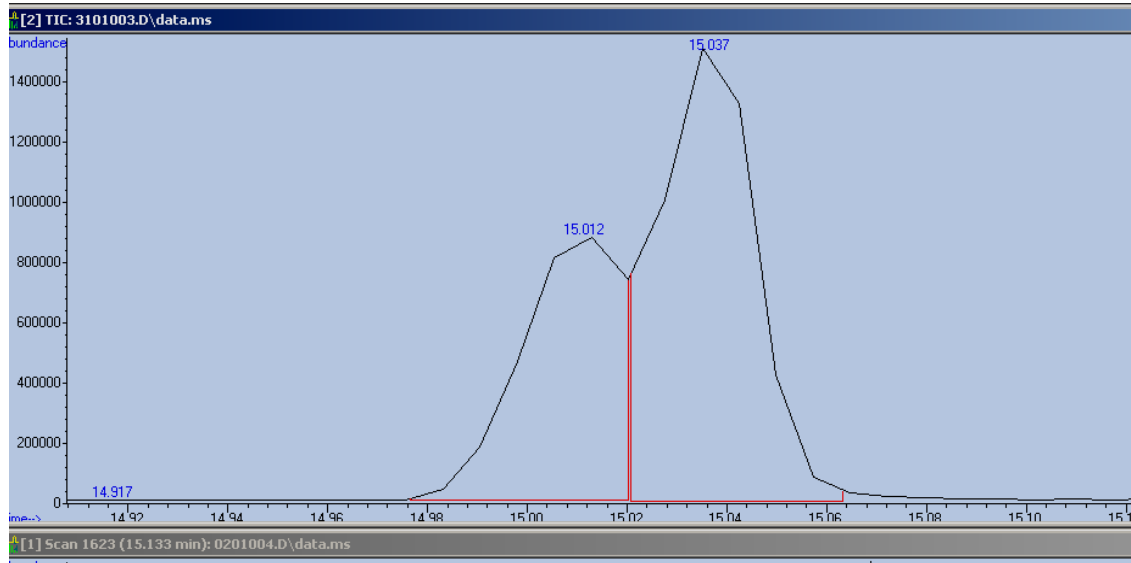
Bredden (width) toppene:  $W_A = 9.048 - 8.978 = 0.07$

$W_B = 9.118 - 9.054 = 0.064$

$$R = 2(9.090 - 9.018) / (0.07 + 0.064) = 1.074$$

**Resolusjon på kolonne DB5-MS-15 meter: R = 1.074**

Ved HP5-15m er RT 15.012 (kodein) og RT 15.037 (klomipramin). Resolusjonsteori er fra kap.1.3.3.



**Figur 40.** Kromatogram fra HP5-30m kolonne med toppene kodein RT15,012 og klomipramin RT 15,037.

RT på de to toppene:  $(t_R)_B = 15.037$  og

$$(t_R)_A = 15.012$$

Bredden (width) toppene:  $W_A = 15.02 - 14.976 = 0.044$

$$W_B = 15.063 - 15.02 = 0.043$$

$$R = 2(15.037 - 15.012) / (0.044 + 0.043) = 0.574$$

**Resolusjon på kolonne HP5-MS-30 meter: R = 0.574**