



FAKULTET FOR NATURVITENSKAP

Institutt for bioingeniørfag

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet

Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Validering av metode for kvantifisering av
perfenazin, flupentiksol og zuklopentiksol i
fullblod på UPLC-MSMS**

**Validation of method for quantification of
Perphenazin, Flupentixol and Zuclopenthixol in
whole blood by using UPLC-MSMS**

Av / by

Amalie Skaar Hestnes

Hanne Aalberg Hammerås

Hellen Tesfaldet Araya

Trondheim, 2019

Forord

Denne bacheloroppgaven er skrevet som en avsluttende oppgave for bioingeniørutdanningen ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige Universitet ved institutt for bioingeniørfag i Trondheim (NTNU). Oppgaven ble gjennomført i perioden 06. mars – 20. mai 2019 ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St. Olavs Hospital.

Vi vil gjerne rette en stor takk til våre faglige veiledere, bioingeniør Ruth-Anne Larsen og kjemiker Miriam Hansen for god praktisk og teoretisk veiledning gjennom oppgaven. Vi vil også takke vår prosessveileder Ragnhild Bach for god veiledning i utforming og retting av oppgaven. I tillegg vil vi rette en stor takk til alle ansatte ved AKF for bruk av lokaler, og en hyggelig og læringsrik periode.

Trondheim, dato 13.05.2019



Amalie Skaar Hestnes



Hanne Aalberg Hammerås



Hellen Tesfaldet Araya

Sammendrag

I dette bachelorprosjektet ble det utført validering av en ny metode for analyttene perfenazin, flupentiksol og zuklopentiksol i fullblod. Metoden i fullblod benyttes for kvantifisering av analyttene i obduksjonsprøver. Metodene for analyttene perfenazin, flupentiksol og zuklopentiksol ble kalt for LDN (lavdose nevroleptika). LDN-metodene ved Avdeling for Klinisk Farmakologi (AKF) benytter seg i dag av proteinfelling for serum og væske-væske ekstraksjon for fullblodsprøver.

Hensikten med metodevalideringen var å undersøke om væske-væske ekstraksjon kan erstattes med proteinfelling, da overgang til proteinfelling som prøveopparbeidelse vil føre til økt effektivitet og mindre bruk av toksiske løsemidler. I tillegg ble det undersøkt om en kan benytte standardrekke med serum for kvantifisering av fullblodsprøver, eller om det måtte bli benyttet en egen standardrekke med fullblod.

For å undersøke dette ble det analysert flere serier med standarder og kontroller i serum og blod. Resultatene ble vurdert ut ifra parametere som presisjon, riktighet og signal/støy-forhold. Standardrekken i serum ble sjekket ut ifra gitte kriterier, om den kunne benyttes for kvantifisering av fullblod, og det ble bestemt en nedre kvantifiseringsgrense. I tillegg ble holdbarheten til prøver benyttet i metoden undersøkt.

Resultatene viste at kriteriene for repeterbarhet, reproducerbarhet og %Bias ble oppfylt, og metodens presisjon og riktighet ble godkjent. Signal/støy-forholdene som ble vurdert var innenfor kriteriene på ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet, noe som tilsier lav interferens. Analysen av standardrekkene i serum viste at én verdi var utenfor kriteriet på 20% fra teoretisk verdi, men i samhandling med medisinsk ansvarlig ved AFK ble det bestemt at standardrekken i serum ble godkjent til kvantifisering av fullblodsprøver. Nedre kvantifiseringsgrense ble bestemt til å være STD 2 med konsentrasjonsnivåene 1,0 nmol for Perfenain og Flupentiksol og 5,0 nmol for Zuklopentiksol. Holdbarhetsanalysen viste god holdbarhet opptil én dag etter prøveopparbeidelsen, og at holdbarheten ved tin/frys var tilfredsstillende.

På grunnlag av gode resultater ble det konkludert at den nye analysemetoden for LDN i fullblod ble godkjent. Dermed vil proteinfelling kunne erstatte væske-væske ekstraksjon som prøveopparbeidelse for fullblodsprøver. I tillegg ble standardkurver fra serum godkjent for bruk i metoden.

Abstract

In this bachelor project, a new method for the analytes Perphenazine, Flupentixol and Zuclopenthixol in whole blood was validated. The whole blood method was used to quantify the analytes in autopsy specimen. The methods were used for quantification of Perphenazine, Flupentixol and Zuclopenthixol is called LDN (low dose neuroleptics). At the Department of Clinical Pharmacology (AKF), the currently used methods for LDN, utilizes both protein precipitation for serum samples and liquid-liquid extraction for whole blood samples.

The aim of this project was to investigate whether liquid-liquid extraction could be replaced by protein precipitation. The transition to protein precipitation, as sample preparation for whole blood will lead to increased efficiency and less use of toxic solvents. Furthermore, the possibility of using standard series of serum for quantification of whole blood samples would be examined, or whether a separate standard series of whole blood must be utilized.

To examine this, several series of standards and controls were analyzed in serum and blood. The results were evaluated based on parameters such as precision, accuracy and signal/noise-ratio. The standard series in serum were checked based on a given criteria, whether it could be used for whole blood quantification and a lower quantification limit was determined. In addition, the shelf life of samples used in the method were examined.

The results were showing that the criteria for repeatability, reproducibility and %Bias were met, and the precision and accuracy of the method were approved. The signal-to-noise ratios that were assessed were within the criteria of ≥ 30 for the quantification ion and ≥ 10 for the qualification ion, indicating low interference. The analysis of the standard series in serum was showing that one value was beyond the 20% criterion from theoretical value, but in a conversation with the medical officer at AFK, it was determined that the standard serum series could be approved for quantification of whole blood samples. The lower limit of quantification was determined to be STD 2 with the concentration levels of 1.0 nmol for Perphenazine and Flupentixol and 5.0 nmol for Zuclopenthixol. The durability analysis was showing good durability up to one day after the sample preparation, and the shelf life of thaw/freeze was satisfactory.

Based on the good results that were obtained, it was concluded that the new analysis method for LDN in whole blood was approved. Thus, protein precipitation could replace liquid-liquid extraction as sample preparation for whole blood samples. In addition, standard curves from serum could be approved for use in the method.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract	III
1. Innledning.....	1
1.1 Hensikt.....	1
1.2 Nevroleptika	1
1.3 Analyttene	2
1.4 Prøveopparbeidelse	3
1.4.1 Væske-væske ekstraksjon.....	3
1.4.2 Proteinfelling og filtrering av fosfolipider.....	4
1.5 Standardrekke og kontroller	5
1.6 Standardkurve.....	5
1.7 Prøvemateriale.....	6
1.8 Internstandard.....	7
1.9 LC-MSMS	7
1.9.1 UPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography).....	7
1.9.2 Massespektrometri.....	9
1.9.3 Kvantifiseringsion og kvalifiseringsion.....	12
1.9.4 Kromatogram.....	13
1.10 Metodevalidering.....	14
1.11 Problemstilling	15
2. Materiale og metode.....	16
2.1 Materialer, kontroller og utstyr.....	16
2.1.1 Standardrekke og kontroller	16
2.1.2 Prøvemateriale.....	17
2.1.3 Reagenser og løsninger.....	18
2.1.4 Utstyr og instrumenter	19
2.2 Fremgangsmåte	20
2.2.1 MassLynx og TargetLynx	21
2.2.2 Standardrekke for serum.....	21
2.2.3 Riktighet.....	21
2.2.4 Reproduserbarhet.....	22
2.2.5 Repeterbarhet.....	22

2.2.6	Holdbarhet	22
2.2.7	Holdbarhet, tin og frys.....	22
2.2.8	Interferens.....	23
2.2.9	Nedre kvantifiseringsgrense	24
2.2.10	Beregningsformler.....	24
3.	Resultater.....	25
3.1	Resultat fra undersøkelse av STD-rekke for serum.....	25
3.2	Resultat fra undersøkelse av metodens riktighet	26
3.3	Resultat fra undersøkelse av metodens reproduserbarhet.....	27
3.4	Resultat fra undersøkelse av metodens repeterbarhet.....	28
3.5	Resultat fra undersøkelse av holdbarhet i opparbeidede prøver	29
3.5.1	Holdbarhet tin/frys.....	32
3.6	Signal/støy-forhold.....	33
3.7	Nedre kvantifiseringsgrense	34
4.	Diskusjon.....	36
4.1	Kan standardrekken for serum brukes som standard for fullblod?.....	36
4.2	Hvordan er metodens riktighet?	36
4.3	Hvordan er metodens reproduserbarhet?.....	36
4.4	Hvordan er metodens repeterbarhet?.....	37
4.5	Hvordan er metodens holdbarhet?.....	37
4.5.1	Tin/frys	38
4.6	Hvordan er metodens signal til støy-forhold	38
4.7	Hva blir metodens nedre kvantifiseringsgrense?.....	38
5.	Konklusjon	40
6.	Kildehenvisning/referanser.....	41
7.	Vedlegg	43

1. Innledning

1.1 Hensikt

Prosjektet ble utført ved St. Olavs Hospital ved AKF. Hvert år blir ca. 60 000 urinprøver, 30 000 serumprøver, 200 obduksjonsprøver og 100 hårprøver analysert for rusmidler og legemidler ved AKF. De fleste stoffene analyseres ved bruk av kromatografi med massespektrometrisk deteksjon. Det jobbes hver dag for å forenkle og automatisere metodene, og i dette prosjektet skal det undersøkes om man kan effektivisere metoden for analyse av perfenazin, flupentiksol og zuklopentiksol, som er lavdose nevroleptika. Metoden for disse analyttene blir kalt LDN ved AKF. Dagens metode benytter væske-væske ekstraksjon som prøveopparbeidelse for LDN i fullblod. For LDN i serum er det blitt validert en ny metode med en enklere prøveopparbeidelse, som benytter seg av proteinfelling. Væske-væske ekstraksjon er en tidkrevende metode, med et høyt forbruk av det toksiske, organiske løsemidlet heksan. Proteinfelling gir en enkel og rask prøveopparbeidelse med mindre forbruk av prøvevolum, reagenser og internstandard. Å gå over til proteinfelling vil føre til økt effektivitet med tanke på tid og ressurser. På grunn av at toksiske løsemidler ikke lenger benyttes, er metoden mindre miljø- og helseskadelig. Hensikten med oppgaven er å finne ut om det er mulig å benytte proteinfelling, i stedet for væske-væske ekstraksjon i LDN-metoden for fullblodsprøver. For å undersøke dette benyttes statistiske metoder, som undersøkelse av presisjon og riktighet. I tillegg skal det undersøkes om en kan benytte serum som standardrekke for fullblod, eller om det må benyttes en egen standardrekke med fullblod for kvantifisering av prøvene.

1.2 Nevroleptika

Nevroleptika medikamenter benyttes hovedsakelig for å behandle pasienter med psykiske sykdommer som i tillegg har psykotiske tendenser, slik som schizofreni, bipolar lidelse og Tourettes syndrom. De ulike medikamentene er med på å kunne lindre symptomer, men har ingen helbredende effekt på psykiske sykdommer. Nevroleptika deles hovedsakelig i to ulike kategorier, førstegenerasjons antipsykotika og atypiske antipsykotika (Burtis & Burns, 2014). Førstegenerasjons antipsykotika ble introdusert på 1950-tallet. Medikamentene blir benyttet for å lindre psykiske symptomer som hallusinasjoner og vrangforestillinger, men er også kjent for å kunne gi motoriske bivirkninger som skjelvninger, muskelstivhet og unormale «rykninger». På 1990-tallet ble det utviklet nye typer nevroleptika medikamenter, kjent som

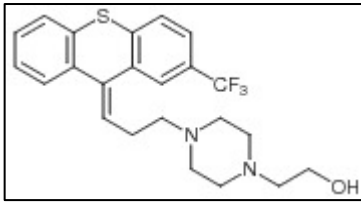
atypiske antipsykotika. Disse gir mindre motoriske bivirkninger, men har større sannsynlighet for å gi bivirkninger som sedasjon (medikamentfremkalt ro) og metabolske bivirkninger. I dag blir begge gruppene av nevroleptika benyttet til behandling, men atypiske anbefales i større grad enn medikamentene som er kategorisert som førstegenerasjons antipsykotika. (Norsk Helseinformatikk, 2013)

De klassiske førstegenerasjons antipsykotika inndeles i to ulike grupper, lavdose nevroleptika og høydose nevroleptika. Disse fordeles ut ifra hvor stor dose av medikamentene pasientene normalt behøver for å oppnå lindring av de psykiske symptomene. Lavdose nevroleptika har normalt sett en døgndose på <10 mg for å oppnå antipsykotisk effekt, men ved høydose nevroleptika er den normale dosen på >100 mg per døgn for ønsket effekt og lindring av symptomer. (Norsk legemiddelhåndbok, 2015) Analyttene som ble analysert i denne oppgaven er perfenazin, zuklopentiksol og flupentiksol, og disse tilhører gruppen for lavdose nevroleptika.

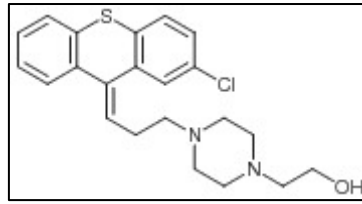
1.3 Analyttene

Flupentiksol og zuklopentiksol er tioksantenderivater, mens perfenazin er et fentiazinderivat. Forskjellen på disse ligger i den molekylære sammensetningen av analyttene.

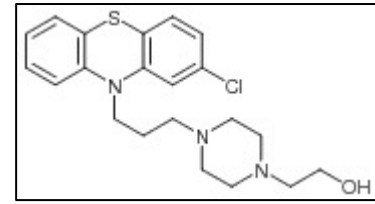
Tioksantenderivater er forbindelser bestående av tre aromatiske ringer med svovel festet på den midterste ringen. Fentiazinderivater består også av tre aromatiske ringer, men på den midterste ringen er det bundet svovel og nitrogen. Den molekylære oppbyggingen av de tre medikamentene vises i Figur 1, Figur 2 og Figur 3. Flupentiksol, zuklopentiksol og perfenazin er dopamin D1 og D2 antagonist. Virkestoffene binder seg til og inhiberer dopamin D1 og D2 reseptorene. Inhiberingen fører til økt frigjøring av hormonene serotonin og noradrenalin, som kontrollerer store deler av humøret og tankeprosessene i hjernen. I tillegg har virkestoffene høy affinitet for α -1A adrenergic reseptor. Sammensetningen av medikamentenes funksjoner gir en humørstabiliserende effekt. (Canadian Institute of Health Research, 2018)



Figur 1: Molekylær struktur for flupentiksol (Felleskatalogen AS, [Digitalisert bilde])



Figur 2: Molekylær struktur for zuclopentiksol (Felleskatalogen AS, [Digitalisert bilde])



Figur 3: Molekylær struktur for perfenazin (Felleskatalogen AS, [Digitalisert bilde])

1.4 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse er viktig for å gjøre analyttene i stand til å separeres og detekteres på LC-MSMS. Prøven kan inneholde partikler som kan interferere med analysen, eller være skadelig for instrumentet. Ved prøveopparbeidelse renses prøven for å fjerne disse komponentene. Det kan også være nødvendig å oppkonsentrere analytten, siden det kan være vanskelig å detektere lave konsentrasjoner. Internstandard kan tilsettes for å kompensere for tap av analytt og for beregning av konsentrasjon. Prøveopparbeidelsene som benyttes for dagens LDN-metoder ved AKF er væske-væske ekstraksjon for fullblod og proteinfelling for serum. (Greibrokk, et al., 1994)

1.4.1 Væske-væske ekstraksjon

Væske-væske ekstraksjon baserer seg på analyttens fordeling i en emulsjonsblanding. Det brukes gjerne en vandig løsning, som for eksempel prøvematerialet analytten skal ekstraheres fra, og et organisk løsemiddel som analytten lett vil løse seg i. Analyttens fordeling mellom de to fasene avhenger av analyttens egenskaper, og kan justeres av pH og temperatur. Ved valg av egnet løsemiddel vil analytten lett kunne løse seg, samtidig som det er selektivt for analytten, slik at uønskede partikler ikke ekstraheres. (Greibrokk, et al., 1994)

Det er en rekke egenskaper som må tas i betraktning for å øke effektiviteten i en væske-væske ekstraksjon. Noen av egenskapene er polaritet, molekylstruktur (syre/base), pH, ionestyrke, flyktighet, volum og tetthet til stoffene. For polaritet må man ta hensyn til prinsippet om at likt løser likt, noe som betyr at en upolar analytt ekstraheres best av et upolart løsemiddel, mens ved mindre upolare analytter må et mindre upolart løsemiddel benyttes. Når det gjelder analytter som er svake syrer eller baser kan man tenke på at baser er protonakseptorer og vil løses godt i løsemidler som er protondonorer, mens syrer er protondonorer, og vil løses bedre i protonakseptorer. Ionestyrken kan påvirkes ved å tilsette litt salt i den vandige løsningen.

Salt vil binde vannmolekylene med sterke ion-dipol krefter, som vil kunne føre til at ikke-elektrolytters løselighet i vann vil avta, mens løseligheten i den organiske fasen vil øke. pH justeres ved tilsetning av en buffer. Løseligheten til svake syrer/baser i organiske løsemidler øker ved avtagende ionisering, mens løseligheten i vandige forbindelser øker med økende ionisering. En buffer kan få analyttene over i nøytral form, og dermed effektivisere ekstraksjonen. Forskjell i tetthet mellom vannfasen og den organiske forenkler det praktiske ved metoden, ved at stoffene lettere vil skille seg. Stoffenes flyktighet kan spille en rolle hvis analytten skal oppkonsentreres ved hjelp av inndampning. Det bør velges et lett flyktig løsemiddel, og det kan tilsettes en sur beskyttelsesløsning for å beskytte analytten hvis man har en flyktig analytt. Ved å benytte lave volum og gjenta metoden flere ganger kan det gi et større utbytte for analytten, mens bruk av større volum vil være enklere og mindre tidkrevende. (Greibrokk, et al., 1994)

Væske-væske ekstraksjon er en tidkrevende metode, men som til gjengjeld gir et rent ekstrakt, høyt utbytte og god oppkonsentrering av analytten. Mange løsemidler som benyttes i væske-væske ekstraksjon kan være brann-, helse- og miljøskadelige. Heksan som benyttes i LDN-metoden for blod er et helse – og miljøskadelig organisk løsemiddel. (Greibrokk, et al., 1994)

1.4.2 Proteinfelling og filtrering av fosfolipider

Plasma, serum og blod inneholder komplekse blandinger av forbindelser som proteiner, salter lipider osv. Disse forbindelsene kan interferere med analyttene under separasjons- og deteksjonsprosessen. Proteinutfelling er en metode som benyttes for å felle ut proteinene ved å tilsette et organisk løsemiddel, en syre eller et salt. Ved utfelling av proteiner vil strukturen til proteinet bli helt eller delvis ødelagt, slik at analyttene frigjøres fra proteinene og forblir i løsningen som skal analyseres. I tillegg fjerner proteinutfelling uønskede stoffer fra plasma, serum eller blod og brukes for rensing av prøven sammen med ekstraksjonsteknikker og kan fjerne opptil 98 % av proteinene i serum. Acetonitril (ACN) benyttes for utfelling av protein på LDN- metoden for blod. Fellingsreagens ACN er et polart organisk løsemiddel, som er 100% blandbar med vann. ACN blandes i noen sekunder med blodet. Fellingsreagenset bør være iskaldt ved bruk, og oppbevares derfor i frysetemperatur. Blandingen sentrifugeres og supernatanten samles for videre analyse. Bruk av høy hastighet ved sentrifugering er viktig for separeringen av supernatanten. Virkningsevnen til ACN er avhengig av volumet. 1ml av ACN fjerner opp til ca. 97.2 % av proteinene i 1,0 mL plasma. Ved øking av ACN- volumet til 2 ml, vil 99.7 % fjernes, noe som gjør supernatanten fri for plasmaproteiner. (Hansen &

Pedersen-Bjergaard, 2015) Ostro™ plate og positive Pressure- 96 Processor (PPP) benyttes for å filtrere ut fosfolipider fra blodet etter proteinfelling. Fosfolipider er en typisk kilde til ionesuppresjon, og matrikseffekt ved LC-MSMS analysering. Matrikseffekten skyldes at forbindelser i prøven eluerer ved samme retensjonstid som analytten, og undertrykker eller forsterker signalet. Fosfolipidene reduserer levetiden på LC- kolonnen og sensitivitet til MS. (Michelsen, 2018)

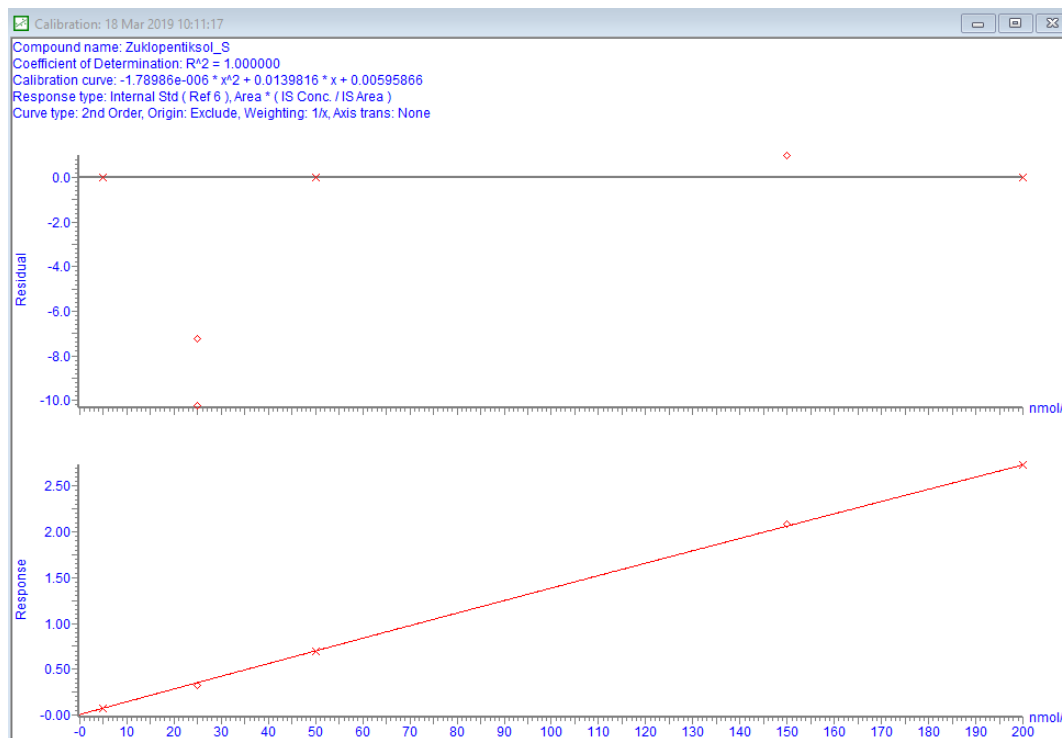
1.5 Standardrekke og kontroller

Standardløsningene og kontrollene blir laget med bestemte konsentrasjoner. Standardene benyttes som kalibratorer og kontrollene benyttes som kvalitetssikring. Ved bruk av kvalitetskontroller kan analyseresultatene enten godkjennes eller forkastes.

Konsentrasjonsnivåene til standardene og kontrollene bestemmes på grunnlag av måleområdet som er satt i metoden fra medisinsk seksjon. Nivåene for standardene og kontrollene fordeles jevnt utover måleområdet, fra lav konsentrasjon til høy konsentrasjon av de aktuelle analyttene. Standardene og kontrollene fortynnes med serum eller blod for å oppnå ønskelig mengde og konsentrasjon. Hver standard og kontroll inneholder alle analyttene som inngår i LDN-metoden.

1.6 Standardkurve

En standardkurve blir konstruert ut ifra responsen til hver av standardene, og benyttes til å beregne konsentrasjonen på prøvene. Responsen til hver standard plottes som funksjon av konsentrasjon, og det tilpasses en linje til punktene. Denne linjen kan tilpasses som en lineær kurve ($y = ax + b$) eller en kvadratisk kurve ($y = ax^2 + bx + c$). De fleste metodene hos AKF benytter kvadratisk kurve. Lineær kurve benyttes når responsen er proporsjonal med konsentrasjonen av analytten, mens kvadratisk kurve benyttes når responsen «mettes» og ikke øker proporsjonalt med konsentrasjonen. (Bye & Roland, 2017) Et eksempel på en standardkurve fra LDN-metoden i dataprogrammet vises i Figur 4. Standardkurven i Figur 4 viser to ulike grafer, som er kvadratisk tilpasset. Den øverste grafen er et residualplott, som viser residual som funksjon av konsentrasjon. Residualplott benyttes for å kunne se fordelingen av avvikene, som burde ligge jevnt spredt rundt den horisontale linjen. Grafen som ligger lengst nede viser responsen som funksjon av konsentrasjonen til prøven.



Figur 4: Eksempel på et residualplott og en standardkurve fra et dataprogram.

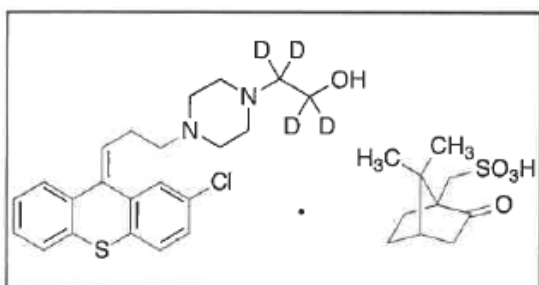
1.7 Prøvemateriale

Prøvematerialet som benyttes til medikamentanalyser ved AKF, er serum for premortale prøver og fullblod for postmortale prøver.

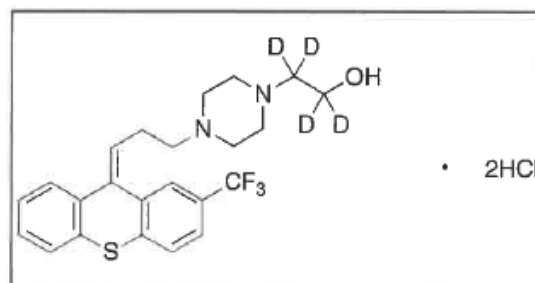
Fullblod er blod hvor alt innholdet er jevnt blandet, slik det forekommer i kroppen. Post mortem vil blodet hemolysere, noe som gjør serum uegnet å benytte. Fullblod er derfor det foretrukne prøvematerialet for medikamentanalyse post mortem. En må ta i betraktning at medikamentkonsentrasjonen i blodet post mortem er høyere enn medikamentkonsentrasjonen pre mortem, siden celledød vil føre til at akkumulerte stoffer slipper ut fra vevet. Postmortale fullblodsprøver skal tas fra perifere vener i låret, men det er ikke alltid dette gjøres. Det kan forekomme store variasjoner i medikamentkonsentrasjon ut ifra hvor i kroppen prøven er hentet fra, så det er viktig med standardiserte prøvetakingsmetoder. Det er også viktig å sørge for at det er rent perifert blod, og ikke en blanding med arterielt blod, på grunn av at arterielt blod har høyere medikamentkonsentrasjon enn perifert veneblod. (Hilberg, 1999) Postmortale fullblodsprøver trenger ofte mye prøveoppbeidelse for analysering. Konsistensen varierer mye hos postmortale prøver, alt fra tykt og klumpete til mer tyntflytende blod. Det kan derfor være vanskelig å pipettere korrekt volum av prøven. Derfor benyttes ofte veiing av blodet i stedet for pipettering.

1.8 Internstandard

Internstandard tilsettes analyse materialet for å finne en beregnende faktor som korrigerer for tap av analytt gjennom prøveopparbeidelsen og analyseringen. Internstandarden bør være mest mulig lik analytten, men ikke ha helt samme masse som analytten, slik at de kan skilles i MS. Som internstandard benyttes molekyler som er mest mulig lik den molekylære strukturen til analytten. Den eneste forskjellen er at molekylene får byttet ut noen av sine atomer med isotoper. Når atomene byttes ut vil molekylmassen endres, på grunn av at isotopene har ulik atommasse. Internstandarden som benyttes i LDN-metoden er Deuterium-merket, det vil si at noen av hydrogenatomene endres til deuteriumatomer. Hvor mange atomer som byttes er avhengig av molekylets stabilitet og masse. (Michelsen, 2018) To eksempler på dette er vist i figurene nedenfor.



Figur 5; Illustrasjon av zyklopentiksol-D₄.
(Toronto Research Chemicals, 2013)



Figur 6; Illustrasjon av flupentiksol-D₄.
(Toronto Research Chemicals, 2013)

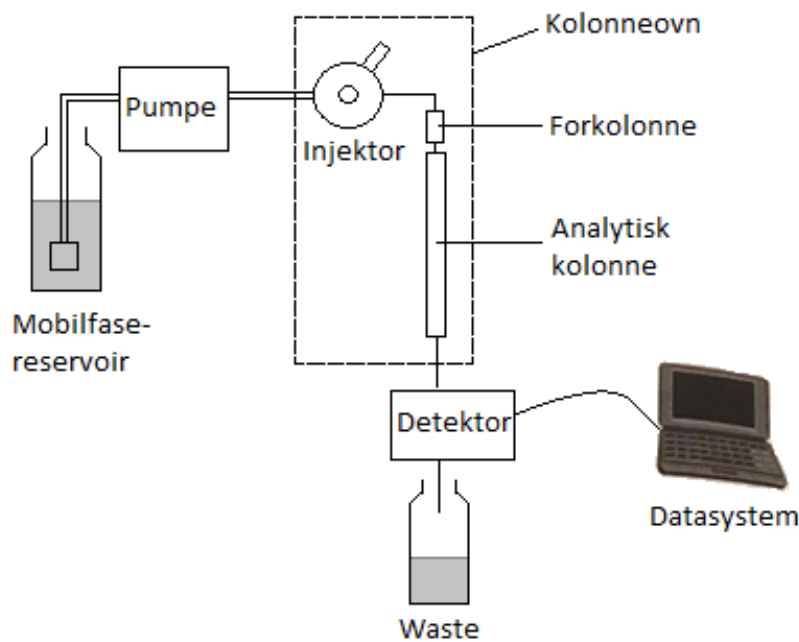
1.9 LC-MSMS

Instrumentet som benyttes til separasjon og deteksjon av analyttene i metoden LDN er UPLC-MSMS, som er væskkromatografi under svært høyt trykk med tandem massespektrometer (MSMS) som detektor.

1.9.1 UPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

UPLC separerer stoffer med ulike kjemiske og fysiske egenskaper, under høyt trykk, i en kolonne fylt med en væskeløsning. Prinsippet bak kromatografi er at komponenter i prøven med ulike fysiske og kjemiske egenskaper vandrer ulikt i et tofase-system, hvor den ene fasen er mobil (beveger seg) og den andre fasen er stasjonær (står stille). Tofase-systemet kan være omvendt fase eller normalfase. Ved omvendt fase vil stasjonærfasen være upolar og mobilfasen polar, mens ved normalfase vil stasjonærfasen være polar, og mobilfasen upolar. (Lie, 2017) I LDN-metoden benyttes omvendt fase. UPLC benytter samme prinsipp som

HPLC (High Performance Liquid Chromatography), men forskjellen ligger i at UPLC kan kjøres under svært høyt trykk, noe som fører til at analysen blir raskere og gir bedre separasjon. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015) UPLC-instrumentet er bygd opp av 3 hoveddeler; “Solvent delivery”- systemet, separasjonskolonnen og detektoren. Oppbygningen av et HPLC-instrument er vist i Figur 7.



Figur 7; Oppbygning av UPLC-instrument.

“Solvent delivery” består av reservoar for mobilfase, en injektor for å hente opp prøve og en pumpe, som pumper mobilfasen inn i kolonnen med ønsket trykk. Reservoaret kan bestå av ulike reagenser som til sammen utgjør mobilfasen. Det kan være flere typer sammensetninger av mobilfasen, som kan brukes til isokratisk eller gradient analyse. Isokratisk analyse er når mobilfasen består av lik sammensetning av løsninger gjennom hele analysen, mens gradient analyse er når mobilfasen endrer sammensetning underveis. “Solvent delivery”-systemet må sørge for at de rette mobilfasene blir pumpet inn i kolonnen i ønsket sammensetning. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)

Kolonne-delen består gjerne av en forkolonne og en analytisk kolonne, der selve separasjonen skjer. Forkolonnen er en kort kolonne, som er med på å rense prøven og beskytter dermed den mer kostbare analytiske kolonnen. Kolonneovnen som omgir kolonnen, varmer opp kolonnen til ønsket temperatur gjennom analysen. I omvendt fase væskechromatografi er den analytiske

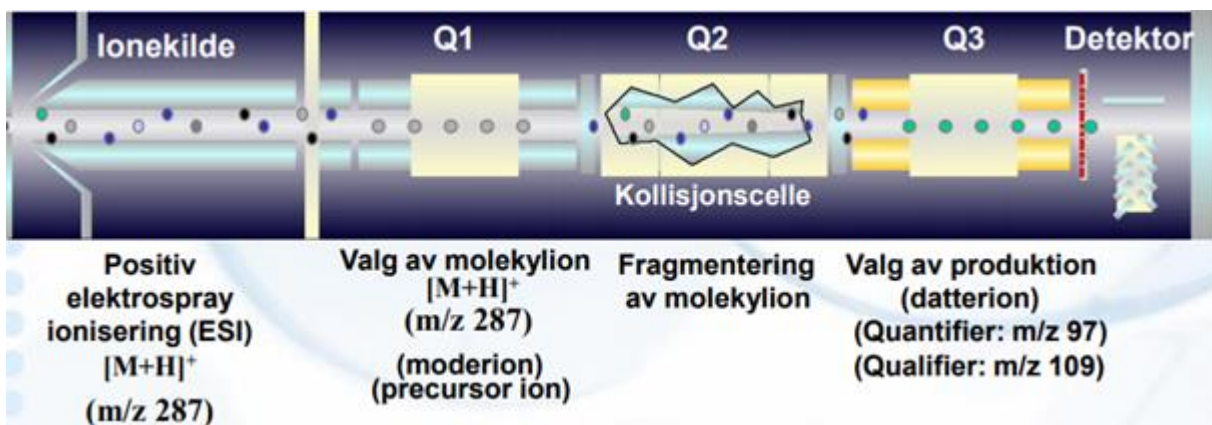
kolonnen oftest en pakket stålkolonne, der den upolare stasjonærfasen (SF) i de fleste tilfeller består av modifisert silika (SiOH-C18). Den polare mobilfasen (MF) kan bestå av en blanding av for eksempel metanol, acetonitril eller vann. (Lie, 2017)

Når prøven injiseres i systemet vil upolare forbindelser ha større affinitet til stasjonærfasen, på grunn av prinsippet om at likt løser likt. Med det menes at molekyler med lik polaritet lettere bindes sammen. Upolare molekyler vil dermed holdes igjen av stasjonærfasen, bevege seg saktere gjennom kolonnen og få høyere retensjonstid. Retensjonstiden påvirkes i tillegg av molekylene størrelse og løselighet i mobilfasen. Mobilfasens «flow» og temperatur i kolonnen kan regulere retensjonstiden til en viss grad. (Greibrokk, et al., 2005)

1.9.2 Massespektrometri

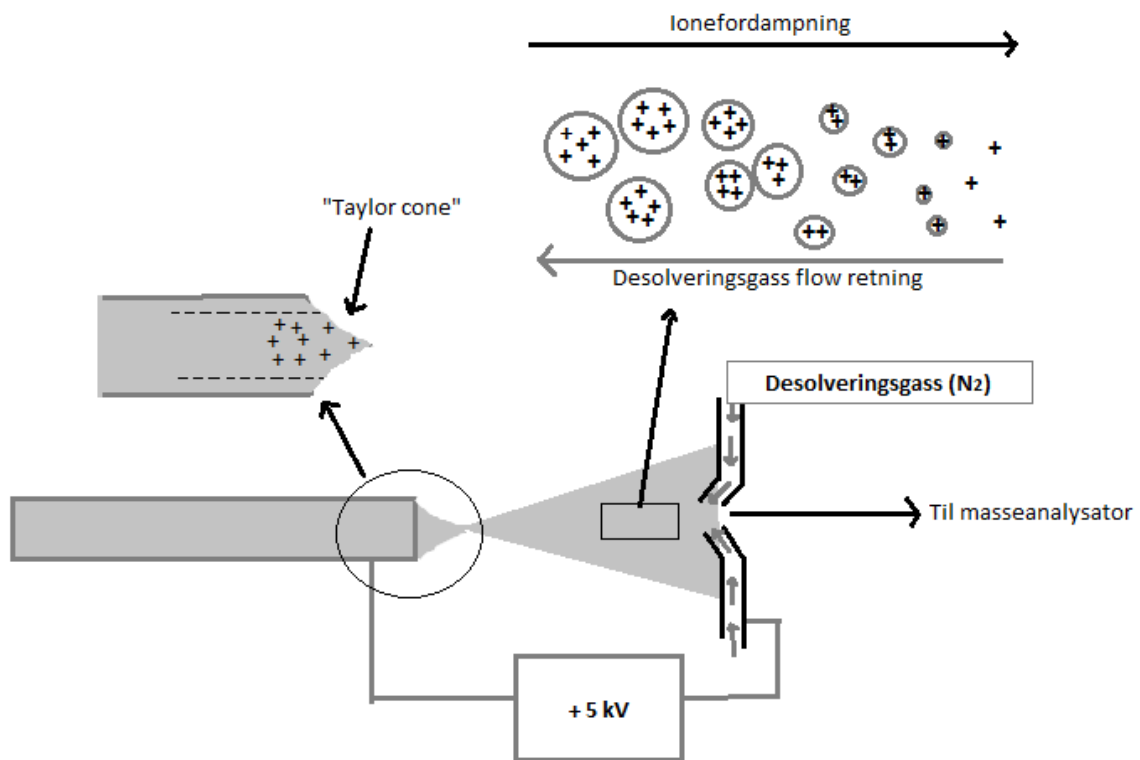
Massespektrometri er en analyseteknikk der molekyler utsettes for en elektrisk ladning, spaltes i fragmenter, separeres etter masse/ladnings-forhold (m/z -ratio) og detekteres. I UPLC-MSMS er detektoren en tandem massekvadrupol. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)

En tandem massekvadrupol er oppbygd av en ionekilde, en massekvadrupol (MS1), en kollisjonscelle, en ny massekvadrupol (MS2) og en detektor. Et eksempel på oppbygningen er avbildet i Figur 8.



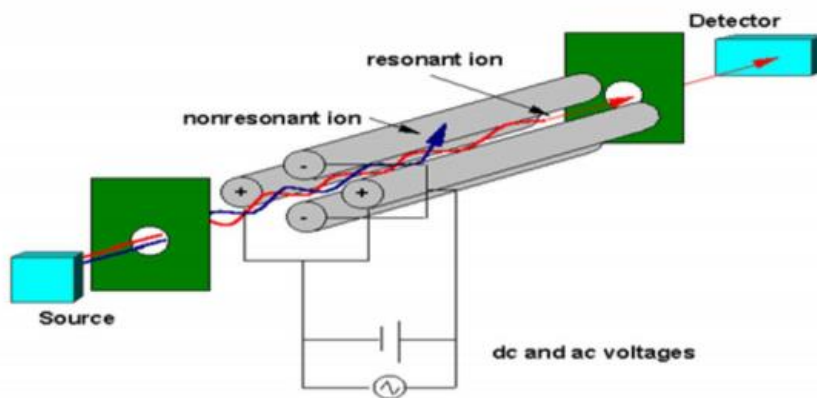
Figur 8; Oppbygning av MSMS med eksempler på m/z -forhold. (Lie, 2017)

Det som skjer når molekylene kommer ut av kolonnen og skal detekteres, er at de transporteres til ionekilden. Det fins flere typer ionekilder, men for denne metoden benyttes elektroprayionisering (ESI). Molekylene fra kolonnen i UPLC må gjøres om til gassfase og ionisereres, slik at de kan detekteres i MS1. Mobilfasen med prøve entrer ionekilden gjennom et kapillærrør, som er påsatt høy spenning. Det vil da genereres en spray av ladede dråper. Ved utgangen av kapillærrøret vil det også blandes inn en nebulizergass som for det meste består av N_2 , som vil hjelpe med å danne dråpene. I motsatt ende av ionekilden vil det appliseres en desolveringsgass av nitrogen (N_2), som vil desolvere dråpene til tørre analyttioner. Deretter kan ionene føres inn i masseanalysatoren, der de separeres etter masse og ladning. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015) Illustrering av ESI vises i Figur 9.



Figur 9; Illustrering av prosessene i ESI. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)

En massekvadrupol består av fire kvartsstaver, som ligger parallelt med hverandre, der to er positivt ladet og to er negativt ladet. En illustrasjon av en massekvadrupol er vist i Figur 10. Slik vil det genereres et elektromagnetisk felt, der kun bestemte ioner kan passere kvadrupolen. Det fins flere metoder for å generere dette feltet. Et eksempel på dette er Multiple Reaction Monitoring (MRM), som kan benyttes for å velge moderion og datterion ved tandem massespektrometri. Ioner som er ustabile i det elektromagnetiske feltet, vil treffe en av kvadrupolene og fanges opp, mens de stabile vil passere. Det benyttes vakuum i systemet for å hindre at ionene kolliderer med hverandre. I MS1 vil bestemte ioner filtreres og slippe inn i kollisjonscellen. Disse ionene blir kalt moderion. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)



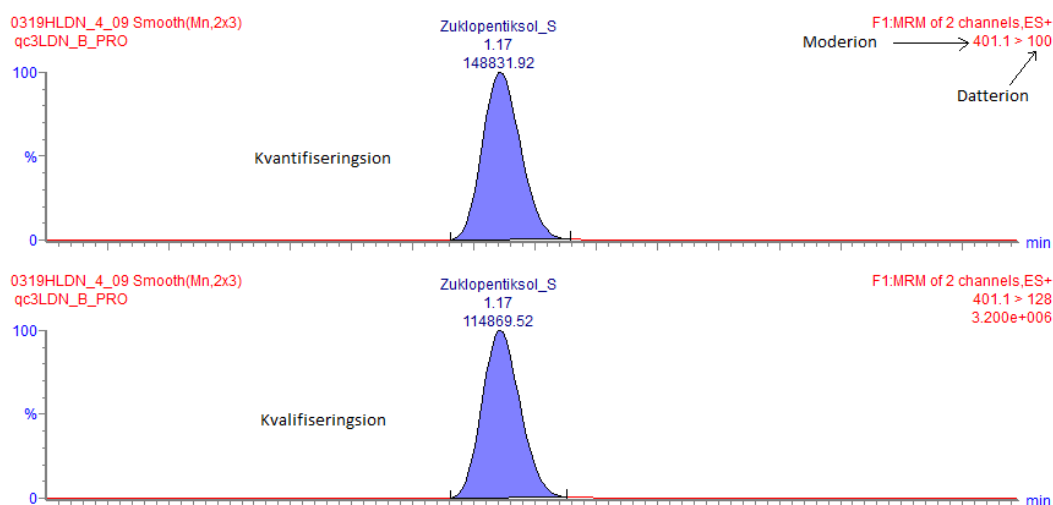
Figur 10; Illustrasjon av oppbygningen til en massekvadrupol. (Lie, 2017)

Kollisjonscellen er en celle med en inert gass, som for eksempel argon. Her vil ionene kolliderer med gassmolekylene og fragmenteres til mindre ioner. De fragmenterte ionene sendes videre til MS2, som vil operere på samme måte som den første kvadrupolen. De bestemte ionefragmentene som passerer MS2 blir kalt datterion. Ionene kan for eksempel detekteres av en fotomultiplikator, som gjør om signalet fra ionene, og amplifiserer det, slik at det kan avleses på en datamaskin. (Hansen & Pedersen-Bjergaard, 2015)

1.9.3 Kvantifiseringsion og kvalifiseringsion

Når molekylene fragmenteres i massekvadrupolen spaltes de til ulike ionefragmenter. Forskjellige stoffer fragmenterer ulikt, til ett eller flere molekylioner, og gir et slags "fingeravtrykk", som gir verdifull informasjon for identifisering og kvantifisering av analyttene. Ved hver analyse velges ett ionefragment til å være kvantifiseringsion, og ett eller flere ionefragmenter til å være kvalifiseringsioner.

Kvantifiseringsionet er det som benyttes til å regne ut konsentrasjonen av analytten, mens kvalifiseringsionet benyttes til å øke sikkerheten kvalitativt på analysen. Ved å benytte to ulike ioner for å identifisere analytten, vil identifiseringen være sikrere enn ved bruk av bare ett ion. Kvalifiseringsionet vil derfor kunne fungere som en kontroll på at det er korrekt analytt som blir analysert. Kvantifiserings- og kvalifiseringsionene har lik retensjonstid. Hvilke av molekylionene som skal være kvantifiseringsion og kvalifiseringsion velges under metodeutviklingen. En velger oftest det ionet med høyest areal og S/N-forhold (signal/noise) til å være kvantifiseringsionet, på grunn av at det er det ionet som har minst interferens. Forholdet mellom arealet til kvantifiseringsionet og kvalifiseringsionet skal ikke avvike mer enn de gitte grensene som er satt i metoden. (Bye & Roland, 2017) Figur 11 viser et eksempel på et kromatogram fra et kvantifiseringsion og et kvalifiseringsion. Figuren viser også hva som er masse/ladnings-forholdet til moderion og datterion, som skaper et unikt "fingeravtrykk".



Figur 11; Eksempel på kromatogram for kvantifiseringsion og kvalifiseringsion.

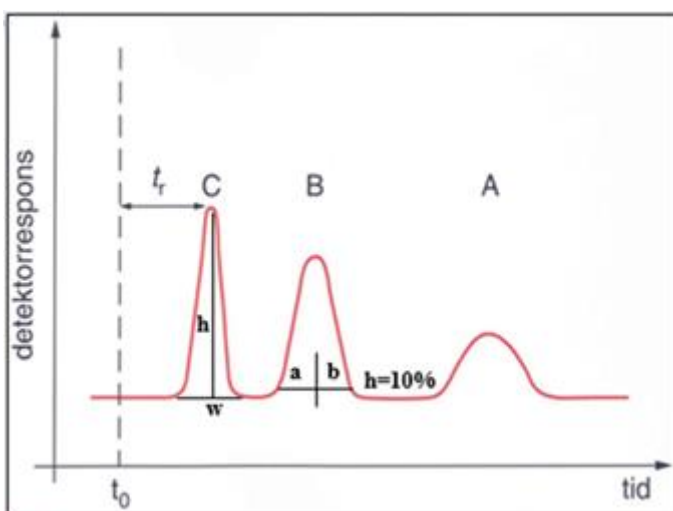
1.9.4 Kromatogram

Etter hvert som stoffene kommer ut av kolonnen vil de registreres i en detektor, for eksempel et massespektrometer, som gir en respons som er proporsjonal med konsentrasjonen av stoffene. Dette kan avleses som et kromatogram på datamaskinen, som viser responsen som funksjon av tid. (Greibrokk, et al., 2005)

Retensjonstiden (t_R) er den tiden det tar fra prøven injiseres i kolonnen, til analytten registreres som en topp i kromatogrammet. Denne tiden er spesifikk for ulike stoffer, såfremt en har like og stabile forhold, og brukes til å identifisere stoffene. Et dataprogram beregner forventet retensjonstid, slik at man vet hvilken retensjonstid prøvene skal ha, og det fungerer som en kvalitetssikring på at man har riktig analytt. Forventet retensjonstid beregnes ut ifra STD 2 og STD 3 som referanse. Ved AKF beregnes forventet retensjonstid ut i fra to valgfrie standarder. (Bye & Roland, 2017)

For hver topp kan man se på topphøyde eller areal. Arealet under kurven blir regnet ut i dataprogrammet, og det er arealet som hovedsakelig brukes til å beregne konsentrasjonen til analytten. Responsen regnes ut fra arealet ved å ta arealet av analytten delt på arealet av IS. Arealet bør være tilstrekkelig høyt til å kunne skille det fra andre urenheter i prøven. Ved mindre areal er det mer usikkert at det er korrekt analytt som er detektert. Dette må også ses i forhold til S/N-forholdet. (Bye & Roland, 2017)

De ulike parameterne i et kromatogram fremvises i Figur 12. Topp C viser båndbredden (w), som er bredden til hver topp ved grunnlinjen, og topphøyde (h). Jo smalere båndbredde, jo



Figur 12; Skisssering av de ulike delene av et kromatogram. (Lie, 2017)

lettere er det for dataprogrammet å separere toppene. Toppene kan være asymmetrisk, som for eksempel ved tailing (haledannelse). Tailing skyldes at enkelte molekyler av samme stoff holdes igjen lenger i kolonnen, som følge av for eksempel slitt kolonne eller dannelse av hydrogenbindinger. Eventuelt kan det oppstå fronting, hvor det motsatte skjer, der enkelte molekyler av samme stoff kommer ut raskere av kolonnen, som følge av for eksempel for mye stoff i kolonnen.

Asymmetrien kan beskrives med asymmetrifaktoren $AS = b/a$, hvor en topp deles i to og avstanden mellom forkant og bakkant i 10% høyde fra bunnlinjen måles ut. De forskjellige komponentene for å beregne asymmetri vises i topp B i Figur 12. (Greibrokk, et al., 2005)

1.10 Metodevalidering

Metodevalidering har som hensikt å kvalitetssikre laboratorienes analysemetoder, slik at de følger internasjonale kvalitetskrav og teste om analysemetoden er godt egnet til tiltenkt formål. Begrepet validering kan defineres som fremskaffing av objektive bevis på en undersøkelse hvor spesielle gitte krav er innfridd. Ved en full metodevalidering blir helheten av metoden undersøkt. Det innebærer tre hovedkategorier; klinisk nytteverdi, praktisk egnethet og analytisk kvalitet. Gjennom denne oppgaven blir bare den analytiske kvaliteten av metoden vurdert. (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002)

Den analytiske kvaliteten er sammensatt av ulike parametere, hvor de statistiske beregningene må ligge innenfor gitte krav for å kunne godkjennes. De mest sentrale parameterne er riktighet, presisjon og måleområdet. (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002)

Riktighet er et mål på overensstemmelse mellom gjennomsnittlig analysert verdi fra en stor serie med mange analyseresultater og en sann verdi. Riktighet innebærer metodens sporbarhet, holdbarhet av analyttene og analytisk spesifisitet. I tillegg undersøkes interferens, holdbarhet og linearitet. Ved kvantitative analysemetoder uttrykkes riktighet som systematisk feil (bias). Sammenligning av beregnet %Bias med tillatt %Bias, kan fortelle om den systematiske feilen er innenfor de gitte analytiske metodekravene. Hvis beregnet %Bias er lik eller mindre enn det tillatte kravet om %Bias, er riktigheten for analysen godkjent. (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002)

Presisjonen forteller noe om analysemetodens evne til å kunne gi de samme resultatene ved gjentatte målinger. Reproduserbarhet og repeterbarhet er de viktigste måleparameterne ved undersøkelse av presisjon. Reproduserbarhet undersøker presisjonen til metoden når prøver analyseres flere ganger under endrede betingelser. Dato, tid og ulike personer som opparbeider prøvene kan være eksempler på endrede betingelser. I tillegg kan reproduserbarheten benyttes som et mål for analytisk usikkerhet, men det er da viktig at undersøkelsen foregår over lengre tid for å få med alle tenkelige variabler. Repeterbarhet er “innen-serie variasjon”, det vil si at flere målinger av samme prøvemateriale utføres med

samme målebetingelser. Undersøkelse av repeterbarhet bør utføres over kort tid, og de skal gjøres på samme analyseinstrument og av samme person. Repeterbarheten kan benyttes som et uttrykk for variasjon i analysen, og kan benyttes til å sjekke usikkerhetskildene. (Rustad, 2001) (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002)

Måleområdet forteller om hvilket område analytten kan analyseres i, og hvilket område metoden gir et resultat med gitt usikkerhet. Måleområdet defineres av en øvre kvantifiseringsgrense og en nedre kvantifiseringsgrense. I denne oppgaven er det bare estimert en nedre kvantifiseringsgrense ut i fra undersøkelsene. (Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002)

1.11 Problemstilling

Hensikten med denne oppgaven for AKF var å effektivisere analysemetoden for LDN i fullblod og unngå bruk av helseskadelige reagenser, ved å undersøke om proteinfelling kan erstatte væske-væske ekstraksjon i prøveoppbeholdelsen. Med bakgrunn i dette, er følgende problemstillinger satt:

- *Kan den nye analysemetoden for perfenazin, zuklopentiksol og flupentiksol godkjennes ut fra gitte kriterier, og kan proteinfelling erstatte væske-væske ekstraksjon i prøveoppbeholdelsen for fullblodsprøver/obduksjonsprøver?*
- *Kan serum-standardkurver benyttes til kvantifisering av LDN-analyttene i fullblod/obduksjonsprøver?*
- *Hvordan er holdbarheten for ferdigoppbeholdede fullblodsprøver i LDN-analysen?*
- *Hva blir den nedre kvantifiseringsgrensen for LDN fullblodsprøver ved bruk av den nye analysemetoden?*

2. Materiale og metode

2.1 Materialer, kontroller og utstyr

2.1.1 Standardrekke og kontroller

I hvert analyseoppsett ble tre standarder i serum analysert, STD 2, 3 og 4 i serum. I tillegg ble det benyttet to kontroller i serum, QC 2 og 3. Standardene ble laget med forskjellige konsentrasjoner som var spredt utover hele måleområdet. For kontrollene ble det laget én kontroll med høy konsentrasjon, og én med lavere konsentrasjon. Konsentrasjonsnivåene for standardrekken og kontrollene som ble benyttet vises i Tabell 1, samme konsentrasjonsnivåene ble benyttet for prøvene.

Tabell 1; Konsentrasjonsnivåer for standarder, kontroller og prøver som ble benyttet i metoden for LDN i fullblod.

	Perfenazin (nmol/L)	Flupentiksol (nmol/L)	Zukolpentiksol (nmol/L)
STD 1	0,1	0,1	1,0
STD 2	1,0	1,0	5,0
STD 3	5,0	5,0	50,0
STD 4	30,0	30,0	200,0
QC 2	5,0	5,0	25,0
QC 3	25,0	25,0	150,0

Standardrekkene og kontrollene som ble benyttet under forsøkene var laget ferdig av ansatte ved AKF. For tillaging av kontrollene og standardrekken ble det kjøpt inn rent stoff i pulverform. MeOH ble benyttet som løsemiddel for alle analyttene. Tørrstoffene ble veid ut og blandet med løsemiddelet for tillaging av en stockløsning (utgangsløsning) for hver analytt. Det benyttes ulike leverandører for STD og QC, og for de ulike analyttene.

Leverandørene er vist i Tabell 2.

Tabell 2; Oversikt over leverandører som benyttes ved tillaging av standarder og kontroller til LDN ved AKF.

Analytt	Leverandør STD	Leverandør QC
Perfenazin	Chiron	Sigma Aldrich
Flupentiksol	Lundbeck	Sigma Aldrich
Zuklopentiksol	Lundbeck	Lundbeck

Løsningene ble videre benyttet til å lage bruksløsning for LDN. Zuklopentiksol og flupentiksol ble laget sammen i en bruksløsning, men på grunnlag av at perfenazin har lav holdbarhet i bruksløsning ble det laget en egen semistock-løsning for analytten. Semistocken for perfenazin ble direkte tilsatt i 0-serum. Bruksløsningen for zuklopentiksol og flupentiksol ble blandet sammen med 0-serum og semistocken for perfenazin for å danne den ferdige standarden/kontrollen. Leverandører og fremgangsmåten for tillaging av standardrekken og kontrollene, og benyttet volum beskrives mer detaljert i Vedlegg 2, 3, 4 og 5. (TT, 2016)

2.1.2 Prøvemateriale

Ved alle forsøkene som ble utført i forbindelse med denne oppgaven ble det benyttet tillagede standarder og/eller kontroller i fullblod som prøver. Alle prøvene som ble anvendt under denne oppgaven ble laget og fortynnet av personell på kalibreringslaboratoriet ved AKF. Prøvene ble tillagd på samme måte som de benyttede standardene og kontrollene, beskrevet i avsnitt 2.1.1. Bortsett fra at prøvene ble blandet med 0-blod og standardrekken og kontrollene ble blandet med 0-serum. De teoretiske konsentrasjonene til de ferdiglagde prøvene vises i Tabell 1.

For hvert oppsett ble det opparbeidet og analysert minimum én serie med prøver, standarder og kontroller. Standardrekken som ble benyttet besto av STD 2, 3 og 4 i serum. Kontrollene som ble benyttet var QC 2 og 3 i serum, og prøvene var STD 2, 3 og 4, og QC 2 og 3 i fullblod. I tillegg ble det benyttet en blank for serum, STD 0_{serum}, og en blank for blod, STD 0_{blod}. STD 0_{serum} ble analysert én gang før standardrekken og én gang før kontrollene. STD 0_{blod} ble analysert én gang før prøverekken og én gang mellom STD 4_{blod} og QC 2_{blod}. Prøveoppsettet som ble benyttet som grunnlag, vises nedenfor i Tabell 3, og ble kalt "en serie".

Tabell 3; Oversikt over én serie med kontroller, kalibratorer og prøvematerialer i LDN-metode.

Blank	Standardrekke	Kontroller	Prøver
STD 0 _{serum}	STD 2 _{serum}	QC 2 _{serum}	STD 2 _{blod}
			STD 3 _{blod}
STD 0 _{blod}	STD 3 _{serum}		STD 4 _{blod}
	STD 4 _{serum}	QC 2 _{blod}	
		QC 3 _{serum}	QC 3 _{blod}

2.1.3 Reagenser og løsninger

Oversikt over konsentrasjon og produsent til reagenser og internstandard som ble benyttet under LDN-metoden.

Tabell 4; Oversikt over reagenser benyttet i LDN.

Reagens	Formel	Konsentrasjon	Produsent	Bruksområde
Acetonitril HiPerSolv CHROMANORM®	C ₂ H ₃ N (l)	≥ 99,95%	VWR Chemicals	Felling av proteiner, Strong Wash LC-MSMS
Metanol i vann	MeOH (aq)	30 %	Merck Millipore	Reløsning
Ammoniumformat	NH ₄ - format	5 mM, pH 10,1	Sigma Aldrich Norway AS	Mobilfase LC-MSMS, Løsning A
Metanol	MeOH (l)	≥ 99,95%	Merck Millipore	Mobilfase LC-MSMS, Løsning B

Tabell 5; Oversikt over internstandarden (IS) i LDN.

Analytt	Konsentrasjon (ng/mL)	Produsent	Løsemiddel
Perfenazin-d ₄	10	CDN Isotopes	50% MeOH i H ₂ O
Flupentiksol-d ₄	20	TRC/SIGMA	
Zuklopentiksol-d ₄	200	TRC/SIGMA	

2.1.4 Utstyr og instrumenter

Instrumenter og utstyr som ble benyttet under prøveopparbeidelse og analysering er oppført i Tabell 6.

Tabell 6; Oversikt over utstyr og instrumenter benyttet i LDN.

Utstyr/instrument	Navn	Produsent
Pipetteringsrobot	Hamilton ML Star	Hamilton Robotics AB
Pipetteringsrobot	Tecan Freedom Evo	Tecan Schweiz AG
Prøvefiltreringsplate	OSTRO™ 96-Well Plate 25 mg 1/Pkg	Waters
96-dypbrønnsplate, 2 mL	2 mL Square Well Collection Plate	Waters
PPP-modul til prøvefiltrering	Positive Pressure 96-Processor	Waters
Inndampingsenhet	Ultravap Sample Concentrator	PorvairSciences
Forseglingmaskin	MiniSeal 2 Automatic Single Plate Heat Sealer 110v/230v	Porvair/Teknolab
Platemikser	Co-mix Multi-format	VITL/Teknolab
LC-MSMS		
Forkolonne	VanGuard™ BEH C18 1,7 µm	Waters
Analytisk kolonne	Acquity UPLC®BEH C18 1,7 µm, 2,1x50 mm	Waters
UPLC	ACQUITY UPLC® I-Class	Waters
MSMS-detektor	XEVO TQ-S	Waters
Instrumentsoftware	MassLynx	Waters

Oversikt over analysebetingelser og kolonneinnstillinger som ble benyttet under analyseringen vises i Tabell 7 og 8.

Tabell 7; Instrumentinnstillinger LC-MSMS ved LDN-metode i fullblod.

Injeksjonsvolum	8,0 ul
Kolonne-temperatur	50
Autosample-temperatur	10
Pre Inject Wash	1 s
Post Inject Wash	6 s
Needle placement	2 mm fra bunnen
Flow	0,6 mL/min

Tabell 8; Gradientinnstillinger for mobilfasen ved LDN-metode i fullblod. Løsning A er ammoniumformat og løsning B er metanol.

Tid (min)	Gradient:	
	Løsning A (%)	Løsning B (%)
0	35	65
0,7	25	75
1	2	98
1,5	2	98
1,51	35	65
2	35	65

UPLC-MSMS instrumentet benytter m/z-verdier for å identifisere analyttene. m/z-verdiene som er benyttet for identifisering av analyttene i metoden LDN er vist i Tabell 9.

Tabell 9; Oversikt over m/z-verdier for perfenazin, flupentiksol og zuklopentiksol som er benyttet i metoden for LDN.

	m/z-verdier		
	Perfenazin	Flupentiksol	Zuklopentiksol
Kvantifiseringsion	404 > 171	435 > 272	401,1 > 100
Kvalifiseringsion	404 > 143	435 > 265	401,1 > 128

2.2 Fremgangsmåte

100 mL ferdigblandet kalibrator/kontroll/prøve-materiale ble pipettert over til hvert sitt merkede eppendorf-rør med automatpipette. Det ble benyttet forward teknikk med metning for serum, og revers teknikk for fullblod. 25 µL LDN-internstandard ble tilsatt med Eppendorf Multipipette og blandet på whirlmikser i tre sekunder. 375 µL iskald ACN rett fra fryseren ble deretter tilsatt to og to rør av gangen med Eppendorf multipipette og umiddelbart blandet i 15 sekunder på whirlmikser. Rørene ble så sentrifugert på 11000 rpm i tre minutt, og supernatanten ble helt over i merkede ekstraksjonsglass. Rørene ble satt på Hamilton pipetteringsrobot hvor prøvematerialet ble pipettert over til Ostro-platen. Deretter ble PPP benyttet i tre minutter for å filtrere prøvematerialet over i Waters dypbrønnsplate. Dypbrønnsplaten ble satt til inndampning på Ultravap på 40 °C i 40 minutter. Deretter ble

prøven løst på nytt, ved at 200 µL 30 % MeOH ble tilsatt med Tecan pipetteringsrobot. Platen med de reløste prøvene ble sveiset med aluminiumsfolie og mikset ved 2100 rpm i ett minutt. De ble så satt på LC-MSMS for analysering. Fullstendig fremgangsmåte er beskrevet i Vedlegg 1.

2.2.1 MassLynx og TargetLynx

MassLynx er et software-program som benyttes på UPLC-MSMS instrumenter fra Waters Corporation. Det er en plattform som inneholder programmeringsinformasjon for prøvene i de ulike analysene, i tillegg til innstillinger av analyseinstrumentene og massespektrometrisk informasjon. MassLynx har et eget program for prosessering, avlesning og tolking av prøveresultater. Programmet heter TargetLynx og er inkorporert i MassLynx-programmet. Avlesnings-programmet har mulighet til å benytte både lineære og kvadratiske kurver for å prosessere og kvantifisere prøveresultatene. MassLynx og TargetLynx ble benyttet som avlesningsprogram for resultater under forsøkene. (Bye & Roland, 2017)

2.2.2 Standardrekke for serum

For å undersøke om standardrekke i serum kunne benyttes ved analyse av fullblodsprøver, ble tre ulike serier analysert. Seriene ble analysert på tre ulike dager og opparbeidet av tre ulike personer. Standardkurven ble kalibrert ved bruk av standarder i serum. Resultatene bør være mindre enn 20% avvik fra teoretisk verdi for at serum-standardkurve kan benyttes for kvantifisering av fullblodsprøver. I tillegg ble forklaringskoeffisient (R^2) beregnet ut ifra både serum og blodkurver i alle seriene. Forklaringskoeffisienten og %avvik ble beregnet av TargetLynx. For at forklaringskoeffisient skal kunne godkjennes, må resultatet for kvadratisk kurvetilpassing være $R^2 \geq 0,995$.

2.2.3 Riktighet

Riktighet ble regnet ut ved å benytte %Bias (systematiske feil). Bias er prosent avvik som beregnes ut fra sann verdi. Beregningsformelen som ble benyttet for %Bias er vist i Formel 2. For beregning av riktighet ble seks ulike serier analysert, samme serier som ble utført for å undersøke reproduserbarheten. Oppsettene inneholder standarder og kontroller både fra serum og fullblod. Akseptkriteriet for riktighet ble gitt til å være %Bias $\leq 15\%$.

2.2.4 Reproduserbarhet

For å undersøke reproduserbarhet ble det prøveopparbeidet og analysert seks ulike serier med forskjellige endrede betingelser. Alle seriene ble utført på ulike datoer, og de ble prøveopparbeidet av tre ulike personer. Disse parameterne utgjorde de endrede betingelsene. Etter analyseringen ble prøveresultatene benyttet til å beregne middelerdi og %CV. Beregningsformlene som ble benyttet vises i Formel 1 og Formel 4. Akseptkriteriet for %CV ble gitt til å være $\leq 20\%$.

2.2.5 Repeterbarhet

For å undersøke repeterbarheten til metoden ble det opparbeidet og analysert én serie med seks paralleller av QC 2 blod og QC 3 blod. Alle prøvene ble opparbeidet og analysert av samme person, med samme metode og på samme dag. Prøveresultatene fra analyseringen ble benyttet til å beregne middelerdi og %CV. Beregningsformlene er vist i Formel 1 og Formel 4. Akseptkriteriet for repeterbarhet ble gitt til å være $\%CV \leq 10\%$.

2.2.6 Holdbarhet

Holdbarheten for metoden ble undersøkt ved å analysere én serie med ferdigopparbeidede prøver samme dag som opparbeidelsen (Dag 0), én dag (Dag 1) og tre dager etter opparbeidelsen (Dag 3). De ferdigopparbeidede prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 10 °C. Konsentrasjonsendringen fra Dag 0 til Dag 3 ble regnet ut som prosent-avvik fra Dag 0. Prosentavvik fra Dag 0 til Dag 1 ble også regnet ut, for å se om holdbarheten var godkjent etter 1 dag. Beregningsformelen for %avvik fra Dag 0 er vist i Formel 3. I tillegg ble resultatene for IS ved Dag 3 og Dag 1, sammenlignet med Dag 0 ved å se på endringer i arealet. Akseptkriteriene for %avvik ble gitt til å være $\leq 15\%$ for QC og STD, og $\leq 20\%$ for reelle pasientprøver (postmortale prøver).

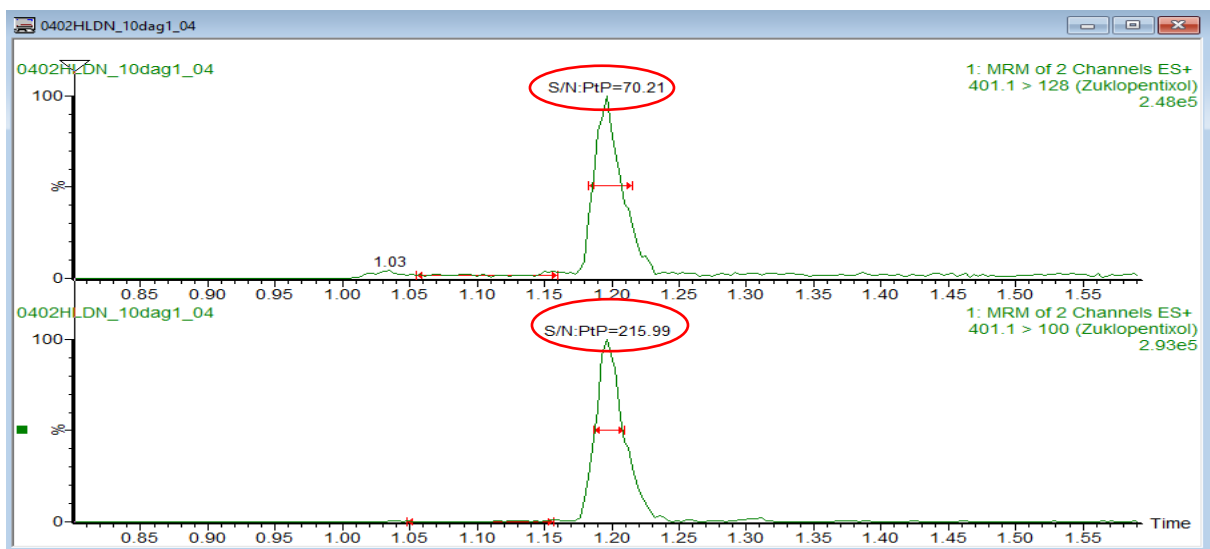
2.2.7 Holdbarhet, tin og frys

Under undersøkelse av holdbarhet ved tining og frysing av prøver, ble én standardrekke og kontroller av serum benyttet. I tillegg ble det opparbeidet og analysert tre paralleller av QC 2 og QC 3 i blod uten tin/frys, og tre paralleller av QC 2 og QC 3 i blod med tin/frys. Tre paralleller av QC 2 og tre paralleller av QC 3 ble frosset og opptint tre ganger hver, før de ble

opparbeidet som normalt sammen med de andre parallellene, standardrekken i serum og serumkontrollene. Alle prøvene ble analysert på LC-MSMS instrumentet i samme serie. QC 2 og QC 3-parallellene uten tin/frys ble benyttet som referanseverdier. Prosentavvik fra referanseverdiene ble beregnet for hver enkelt QC. Akseptkriteriet for holdbarheten i tin/frys ble gitt til å være %avvik $\leq 20\%$.

2.2.8 Interferens

For å undersøke interferens ble én serie opparbeidet og analysert. Prøveresultatene for STD 2_{blod} og STD 2_{serum} ble benyttet til å beregne signal til støy-forholdet (S/N). Forholdet ble beregnet i MassLynx med eget program, for å vurdere mulig interferens i analysemetoden. Et eksempel på dette er vist i Figur 13.



Figur 13; Eksempel på beregning av signal til støy-forhold på MassLynx. Den øverste grafen viser et eksempel på et kromatogram for et kvalifiseringsion og det beregnede S/N-forholdet for ionet. Den nederste grafen viser kromatogrammet og S/N-forholdet for tilhørende kvantifiseringsion. De beregnede S/N-forholdene er markert med en rød ring.

S/N ble sammenlignet med S/N fra en tidligere STD 2_{serum}-prøve som ble analysert i fullvalidert metode for LDN i serum av ansatte ved AKF. Det ble satt i kriteriene at S/N-forholdene i fullblodsmetoden skulle være større eller lik samme størrelsesorden som den fullvaliderte metoden. I tillegg ble kromatogrammene til prøvene sammenlignet og visuelt undersøkt for interfererende topper. Akseptkriteriene for S/N ble gitt til å være ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet.

2.2.9 Nedre kvantifiseringsgrense

STD 1_{blod} og STD 1_{serum} ble analysert, i tillegg til én serie, for å vurdere om lavere konsentrasjoner på standardene kunne godkjennes. Vurderingen ble gjort ved å se på %avvik fra teoretisk verdi, interferens/signal til støy- forhold og areal, og se om disse var innenfor gitte kriterier. Disse beregningene ble utført av software-programmet TargetLynx. Ved AKF er det satt kriterier om at S/N skal være over 30 for kvantifiseringsionet og 10 for kvalifiseringsionet i kromatogrammet til laveste standard. Areal må ses i forhold til S/N-forholdet. Prosentvis avvik fra teoretisk verdi skulle være $\leq 20\%$.

2.2.10 Beregningsformler

Det ble hovedsakelig benyttet tre ulike beregningsformler ved validering av ny metode for LDN fullblod. I tillegg ble det benyttet en del beregningsfunksjoner i software-programmene for LC-MSMS, MassLynx og TargetLynx, for å kunne beregne signal til støy-forhold, areal, konsentrasjon og lineariteten til standardkurvene. Beregningsformlene som ble benyttet i denne oppgaven vises nedenfor.

%CV ble benyttet under beregning av reproduserbarhet og repeterbarhet, og vises i Formel 1.

$$\%CV = \frac{SD-\text{avvik}}{\text{Middelverdi}} \times 100\% \quad [1]$$

Beregningsformelen for % BIAS eller %-avvik fra sann verdi ble benyttet ved undersøkelse av riktighet for LDN i fullblod. Formelen vises i Formel 2.

$$\%BIAS = \frac{(X_{\text{Middelverdi}} - X_{\text{Teoretisk verdi}})}{X_{\text{Teoretisk verdi}}} \times 100\% \quad [2]$$

Ved undersøkelse av holdbarheten ble %-avvik fra $X_{\text{Referanseverdi}}$ benyttet. Beregningsformelen for %-avvik vises i Formel 3.

$$\%avvik \text{ fra } X_{\text{Referanseverdi}} = \frac{(X_{\text{Målt verdi}} - X_{\text{Referanseverdi}})}{X_{\text{Referanseverdi}}} \times 100\% \quad [3]$$

Beregning av middelverdi ble benyttet under flere av undersøkelsene. Beregningsformelen vises i Formel 4.

$$\text{Middelverdi} = \frac{(X_1 + X_2 + \dots + X_n)}{n} \quad [4]$$

3. Resultater

3.1 Resultat fra undersøkelse av STD-rekke for serum

Resultatet for undersøkelse av STD-rekke for serum er presentert i Tabell 10. Resultatene av STD-rekke for serum godkjennes når %avvik $\leq 20\%$. Undersøkelsen av standardrekke ble utført ved å benytte tre ulike serier som ble opparbeidet og analysert på forskjellige tidspunkter og av ulike personer. Prøvene (STD_{blod} og QC_{blod}) ble kalibrert ved å benytte serum som standardkurve. Rådataene fra forsøkene 0321HLDN_5, 0325HLDN_6 og 0326HLDN_7 ble benyttet for å undersøke om standardrekken i serum kunne benyttes for metoden for fullblod. Fullstendig rådatamateriale er vist i Vedlegg 6-8.

Tabell 10; Oversikt over resultatene for undersøkelse av standardrekke i serum.

Analytt	ID	% avvik fra teoretisk verdi		
		0321HLDN_5	0325HLDN_6	0326HLDN_7
Perfenazin	QC 2 _{serum}	-4,18	0,06	-5,54
	QC 3 _{serum}	-5,10	-1,60	-0,11
	QC 2 _{blod}	3,18	11,11	4,01
	QC 3 _{blod}	4,40	7,48	5,01
	STD 2 _{blod}	16,29	21,35	18,74
	STD 3 _{blod}	10,26	9,12	6,10
	STD 4 _{blod}	5,79	2,58	2,35
Flupentiksol	QC 2 _{serum}	6,33	6,53	6,17
	QC 3 _{serum}	9,79	5,27	-0,67
	QC 2 _{blod}	11,18	4,27	5,67
	QC 3 _{blod}	7,00	-0,20	1,43
	STD 2 _{blod}	-1,46	0,82	-12,07
	STD 3 _{blod}	10,98	-2,63	-2,98
	STD 4 _{blod}	8,06	-6,19	-5,13
Zuklopentiksol	QC 2 _{serum}	0,20	-5,33	-4,66
	QC 3 _{serum}	0,96	-0,81	1,29
	QC 2 _{blod}	6,34	-1,87	4,05
	QC 3 _{blod}	3,92	1,74	5,14
	STD 2 _{blod}	2,86	-3,82	0,71
	STD 3 _{blod}	7,52	-2,17	-1,70
	STD 4 _{blod}	4,60	-2,26	-0,46

Alle resultatene fra undersøkelsen var innenfor akseptkriteriet bortsett fra resultatet for STD 2_{blod} for analytten perfenazin. I tillegg ble forklaringskoeffisient (R^2) beregnet ut ifra både serum og blodkurver i alle seriene og fikk verdi $R^2 = 1$ på alle standardkurvene.

Forklaringskoeffisient ble godkjent siden resultatet for kvadratisk kurvetilpassing er $R^2 \geq 0,995$. På grunnlag av godkjente resultater vil standardkurven i serum videre benyttes for kalibrering og kvantifisering av resultater.

3.2 Resultat fra undersøkelse av metodens riktighet

Metodens riktighet ble undersøkt ved å benytte seks analyseoppsett med ulike betingelser. Oppsettene inneholder QC2 og QC3 både for serum og blod for alle analyttene. Oppsettene som er benyttet ved denne forsøket er 0321HLDN_5, 0325HLDN_6, 0326HLDN_7, 0327HLDN_8, 0329HLDN_9 og 0402HLDN_10. Rådata-resultatene vises i Vedlegg 6, 7, 8, 9, 10 og 12. Resultatverdi for de seks ulike parallellene står representert i Tabell 11. Riktighet ble beregnet ved å benytte %Bias. Fullstendig beregningsmateriale er vist i Vedlegg 16.

Tabell 11; Oversikt over resultatene fra undersøkelsen av metodens riktighet.

		Serum		Blod	
		QC 2	QC 3	QC 2	QC 3
Perfenazin	Teoretisk verdi	5,00	25,00	5,00	25,00
	Middelverdi	4,90	24,44	5,34	26,36
	%Bias	2,10	2,23	-6,71	-5,43
Flupentiksol	Teoretisk verdi	5,00	25,00	5,00	25,00
	Middelverdi	5,32	25,69	5,23	24,93
	%Bias	-6,37	-2,77	-4,58	0,29
Zuklopentiksol	Teoretisk verdi	25,00	150,00	25,00	150,00
	Middelverdi	24,73	151,86	25,84	155,01
	%Bias	1,09	-1,24	-3,36	-3,34

Beregnet %Bias var innenfor det gitte akseptkriteriet på %Bias $\leq 15\%$ for alle analyttene både i serum og blod. Riktigheten kunne dermed godkjennes.

3.3 Resultat fra undersøkelse av metodens reproduserbarhet

Forsøket for metodens reproduserbarhet ble utført for å finne ut metodens presisjon mellom ulike prøveoppsett. Det ble benyttet seks prøveoppsett fra seks ulike forsøksdager.

Opparbeidelsen av prøveoppsettene ble fordelt mellom tre analytikere. Resultatene for QC 2 og QC 3 i både blod og serum ble videre benyttet for å beregne gjennomsnittlig %CV.

Beregningsformelen som ble benyttet vises i Formel 1. Rådatamaterialet som ble benyttet under beregningene var fra forsøkene 0321HLDN_5, 0325HDLN_6, 0326HLDN_7, 0327HLDN_8, 0329HLDN_9 og 0402HLDN_10. Rådata-resultatene fra forsøkene vises i Vedlegg 6, 7, 8, 9, 10 og 12. Resultatene fra beregningene for reproduserbarhet vises i Tabell 12, og er hentet fra beregningsmaterialet som er vist i Vedlegg 16.

Tabell 12; Oversikt over resultatene fra undersøkelsen av metodens reproduserbarhet.

		Serum		Blod	
		QC 2	QC 3	QC 2	QC 3
Perfenazin	Middelverdi	4,90	24,44	5,34	26,36
	SD	0,15	0,43	0,16	0,41
	%CV	3,11	1,76	2,91	1,55
Flupentiksol	Middelverdi	5,32	25,69	5,23	24,93
	SD	0,14	1,13	0,25	1,43
	%CV	2,55	4,41	4,86	5,73
Zuklopentiksol	Middelverdi	24,73	151,86	25,84	155,01
	SD	0,91	1,85	0,80	3,67
	%CV	3,67	1,22	3,11	2,37

Alle beregningsresultatene lå under akseptkriteriet for reproduserbarhet, som var satt til å være %CV \leq 20%. Reproduserbarheten kunne derfor aksepteres.

3.4 Resultat fra undersøkelse av metodens repeterbarhet

Undersøkelse av metodens repeterbarhet ble gjort for å finne ut metodens presisjon innenfor én analyserekke. I forsøket ble det benyttet seks paralleller fra QC 2 og QC 3 i blod. For å beregne metodens "innen serie-variasjon" ble %CV beregnet for alle parallellene.

Beregningsformelen som ble benyttet vises i Formel 1. Rådatamaterialet som ble benyttet under beregningene ble hentet fra forsøk 0327HLDN_8, og er vist i Vedlegg 9. %CV, standardavvik og middelværdi fra undersøkelsen av metodens repeterbarhet vises i Tabell 13. Fullstendig beregningsmateriale er vist i Vedlegg 15.

Tabell 13; Oversikt over resultatene fra undersøkelsen av metodens repeterbarhet, hvor det ble benyttet seks paralleller.

		Blod	
		QC 2	QC 3
Perfenazin	Middelværdi	5,46	26,56
	SD	0,08	0,19
	%CV	1,49	0,72
Flupentiksol	Middelværdi	5,32	24,37
	SD	0,16	0,61
	%CV	3,03	2,50
Zuklopentiksol	Middelværdi	25,62	153,12
	SD	0,51	2,29
	%CV	1,99	1,50

Alle resultatene lå godt innenfor det gitte akseptkriteriet på %CV \leq 10%. Undersøkelsen av metodens repeterbarhet kunne dermed godkjennes.

3.5 Resultat fra undersøkelse av holdbarhet i opparbeidede prøver

Holdbarhet i opparbeidede prøver ble undersøkt ved å analysere én serie prøver dag 0, dag 1 og dag 3. %avvikene fra dag 0 ble beregnet for Dag 1 og Dag 3 (Formel 3). %avvikene fra Dag 0 for hvert enkelt medikament i LDN-metoden, dag 1 og dag 3, er fremstilt i Tabell 14, 15 og 16. Rådatamaterialet som ble benyttet til beregningene ble hentet fra forsøkene 0402HLDN_10, 0402HLDN_10dag1, 0329HLDN_9 og 0329HLDN_9_b. Rådatamaterialene er vist i Vedlegg 10-13. Holdbarheten ble vurdert ut ifra akseptkriteriet %avvik \leq 15% for QC og STD.

Tabell 14; Oversikt over resultatene ved undersøkelse av holdbarhet for analytten perfenazin.

Perfenazin	02.04.2019		%avvik dag 1
	Dag 0		
	0402HLDN_10	0402HLDN_10dag1	
QC 2 _{Serum}	5,14	4,98	-3,11
QC 3 _{Serum}	24,31	24,35	0,16
STD 2 _{Blod}	1,05	1,07	1,90
STD 3 _{Blod}	5,49	5,32	-3,10
STD 4 _{Blod}	31,77	32,90	3,56
QC 2 _{Blod}	5,36	5,16	-3,73
QC 3 _{Blod}	26,63	26,94	1,16
	29.03.2019		%avvik dag 3
	Dag 0		
	0329HLDN_9	0329HLDN_9_b	
QC 2 _{Serum}	4,88	5,03	3,07
QC 3 _{Serum}	24,32	25,97	6,78
STD 2 _{Blod}	1,22	1,12	-8,20
STD 3 _{Blod}	5,22	5,33	2,11
STD 4 _{Blod}	30,38	31,05	2,21
QC 2 _{Blod}	5,27	5,42	2,85
QC 3 _{Blod}	25,74	26,73	3,85

Tabell 15; Oversikt over resultatene for undersøkelse av metodens holdbarhet for analytten flupentiksol.

Flupentiksol	02.04.2019	03.04.2019	%avvik dag 1
	Dag 0	Dag 1	
	0402HLDN_10	0402HLDN_10dag1	
QC 2 _{Serum}	5,43	5,52	1,66
QC 3 _{Serum}	25,08	27,52	9,73
STD 2 _{Blod}	1,01	1,00	-0,99
STD 3 _{Blod}	5,15	4,88	-5,24
STD 4 _{Blod}	30,71	31,99	4,17
QC 2 _{Blod}	5,22	5,00	-4,21
QC 3 _{Blod}	25,63	27,08	5,66
	29.03.2019	01.04.2019	%avvik dag 3
	Dag 0	Dag 3	
	0329HLDN_9	0329HLDN_9_b	
QC 2 _{Serum}	5,07	5,76	13,61
QC 3 _{Serum}	24,40	26,55	8,81
STD 2 _{Blod}	0,91	1,00	9,89
STD 3 _{Blod}	4,76	5,18	8,82
STD 4 _{Blod}	26,27	29,86	13,67
QC 2 _{Blod}	4,78	5,57	16,53
QC 3 _{Blod}	22,50	25,78	14,58

Tabell 16; Oversikt over resultatene for undersøkelse av metodens holdbarhet for analytten zuklopentiksol.

Zuklopentiksol	02.04.2019	03.04.2019	%avvik dag 1
	Dag 0	Dag 1	
	0402HLDN_10	0402HLDN_10dag1	
QC 2 _{Serum}	25,64	25,44	-0,78
QC 3 _{Serum}	151,52	150,78	-0,49
STD 2 _{Blod}	5,05	5,00	-0,99
STD 3 _{Blod}	53,56	52,39	-2,18
STD 4 _{Blod}	213,27	211,86	-0,66
QC 2 _{Blod}	26,74	25,46	-4,79
QC 3 _{Blod}	160,35	160,21	-0,09
	29.03.2019	01.04.2019	%avvik dag 3
	Dag 0	Dag 3	
	0329HLDN_9	0329HLDN_9_b	
QC 2 _{Serum}	25,80	25,38	-1,63
QC 3 _{Serum}	153,34	155,96	1,71
STD 2 _{Blod}	5,12	4,99	-2,54
STD 3 _{Blod}	51,50	52,89	2,70
STD 4 _{Blod}	193,94	197,42	1,79
QC 2 _{Blod}	25,56	26,41	3,33
QC 3 _{Blod}	150,39	158,22	5,21

Holdbarheten for alle analyttene var innenfor kriteriene for alle %avvikene dag 1, mens for dag 3 var holdbarheten utenfor kriteriene på én av prøvene. Holdbarheten kunne dermed vurderes som tilfredsstillende for Dag 1, mens den ikke kunne godkjennes for Dag 3.

3.5.1 Holdbarhet tin/frys

Holdbarheten ved tining og frysing av prøver til bruk i metoden ble undersøkt ved å analysere seks paralleller hver av QC 2 og QC 3 i blod. Tre av parallellene var uten tin/frys og ble satt som referanseprøver (REF), mens tre paralleller var med tin/frys. %avvik fra REF for tin/frysprøvene ble beregnet med Formel 3. Rådatamaterialet fra forsøket 0411HLDN_11 ble benyttet for å beregne resultatene, og er vist i Vedlegg 14. Fullstendig beregningsmateriale er vist i Vedlegg 17. Resultatene fra analysen er fremstilt i Tabell 17, tabellen viser gjennomsnittlig %avvik mellom middelverdien til REF og middelverdien til tin/frys. Akseptkriteriet for holdbarheten i tin/frys ble gitt til å være %avvik $\leq 20\%$.

Tabell 17; Oversikt over resultatene for undersøkelsen av tin/frys holdbarhet for opparbeidede prøver med metoden LDN i fullblod.

	0411HLDN_11		%avvik fra ref
	REF	TIN/FRYS	
Perfenazin			
QC 2	5,28	5,19	-1,77
QC 3	26,81	26,59	-0,83
Flupentiksol			
QC 2	4,81	4,79	-0,42
QC 3	23,96	24,38	1,72
Zuklopentiksol			
QC 2	26,52	26,13	-1,46
QC 3	151,94	153,11	0,77

Alle %avvikene var innenfor det gitte akseptkriteriet, og holdbarheten ved tin/frys av prøver til bruk i metoden kunne vurderes som godkjent.

3.6 Signal/støy-forhold

Signal til støy-forholdet ble beregnet for å undersøke mulig interferens. S/N ble beregnet med et eget beregningsprogram i MassLynx, og ble vurdert for STD 2 i serum og blod. I tillegg ble kromatogrammene fra forsøket visuelt vurdert. Resultatene fra analyseforsøket 0326HLDN_7 ble benyttet for å beregne S/N-forholdet. Rådataene og kromatogrammene for S/N vises i Vedlegg 8, 18 og 19. Signal til støy-forholdet ble sammenlignet med S/N-forholdet til STD 2_{serum} analysert med den fullvaliderte rutinemethoden for LDN i serum hos AKF. Kriteriene for sammenligningen ble gitt til at resultatene skulle være i samme størrelsesorden eller høyere enn resultatene fra den fullvaliderte metoden. Kromatogrammene og resultatene fra rutinemethoden vises i Vedlegg 20. Resultatene for signal til støy-forholdet vises i Tabell 18. Akseptkriteriene for dette forsøket ble gitt til å være S/N ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet.

Tabell 18; Oversikt over resultatene for undersøkelse av S/N-forhold ved LDN-metoden.

Analytter	Produksjon	m/z-verdier	Signal til støy-forhold		
			STD 2 _{serum}	STD 2 _{blod}	STD 2 _{fullvalidert metode}
Perfenazin	Kvantifiseringsion	404 > 171	379	1219	716
	Kvalifiseringsion	404 > 143	235	536	483
Flupentiksol	Kvantifiseringsion	435 > 272	96	77	120
	Kvalifiseringsion	435 > 265	94	171	242
Zuklopentiksol	Kvantifiseringsion	401.1 > 100	237	492	228
	Kvalifiseringsion	401.1 > 128	29	145	2060

Alle S/N-forholdene var innenfor kriteriene for kvantifiseringsionene (≥ 30) og kvalifiseringsionene (≥ 10). S/N-kromatogrammet for zuklopentiksol viste litt interferens. De resterende S/N-kromatogrammene viste ingen tydelig interferens. Ved sammenligning av S/N-forholdene mellom ny metode og fullvalidert metode viste resultatene at det var noen forskjeller mellom S/N-forholdene.

3.7 Nedre kvantifiseringsgrense

Nedre kvantifiseringsgrense for LDN-metoden i fullblod ble bestemt ved å analysere STD 1 i serum og blod. For å vurdere om resultatene kunne godkjennes ble S/N – forhold, areal og %avvik fra teoretisk verdi vurdert opp imot gitte akseptkriterier. Rådatamaterialet er hentet fra forsøk 0329HLDN_9, og er vist i Vedlegg 10. Kromatogrammene og S/N-forholdene er vist i Vedlegg 21-22. Disse verdiene ble hentet ut fra TargetLynx, og resultatene for S/N og areal er vist i Tabell 19, mens %avvik fra teoretisk verdi er vist i Tabell 20. Kriteriene for S/N er ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet. S/N-verdiene ble også vurdert mot arealet, som burde være ≥ 200 . %avvik fra teoretisk verdi skulle være $\leq 20\%$.

Tabell 19; Oversikt over resultatene for undersøkelse av metodens nedre kvantifiseringsgrense.

Analytter	Produksjon	m/z-verdier	Signal til støy-forhold		Areal _{kvantifiseringsion}	
			STD 1 _{serum}	STD 1 _{blod}	STD 1 _{serum}	STD 1 _{blod}
Perfenazin	Kvantifiseringsion	404 > 171	39	119	555	1645
	Kvalifiseringsion	404 > 143	11	67		
Flupentiksol	Kvantifiseringsion	435 > 272	9	50	83	297
	Kvalifiseringsion	435 > 265	4	23		
Zuklopentiksol	Kvantifiseringsion	401.1 > 100	49	57	955	1522
	Kvalifiseringsion	401.1 > 128	7	14		

Tabell 20; Oversikt over %avvik fra teoretisk verdi for STD 1.

	ID	Teoretisk verdi	Konsentrasjon	%avvik
Perfenazin	STD 1 _{serum}	0,1	-	-
	STD 1 _{blod}	0,1	-	-
Flupentiksol	STD 1 _{serum}	0,1	0,07	-30,72
	STD 1 _{blod}	0,1	0,05	-45,18
Zuklopentiksol	STD 1 _{serum}	1	0,67	-32,64
	STD 1 _{blod}	1	0,15	-84,56

Resultatene havnet utenfor akseptkriteriene ved tre av verdiene for S/N for STD 1_{serum} og et av arealene ble vurdert for lavt. S/N-verdiene for STD 1_{blod} var alle innenfor. Resultatene for %avvik fra teoretisk verdi viser at alle verdiene er utenfor kriteriet, og at det ikke ble kvantifisert noe resultat for perfenazin. I tillegg ble kromatogrammene visuelt vurdert, og resultatet var at de fleste hadde lav topp på grunn av dårlig signal. STD 1 kunne dermed ikke godkjennes som nedre kvantifiseringsgrense for metoden.

4. Diskusjon

4.1 Kan standardrekken for serum brukes som standard for fullblod?

Ved å undersøke tre ulike serier viser resultatene at standardrekken for serum kan benyttes som standard for fullblod. I tillegg til %avvik ble forklaringskoeffisient beregnet for alle tre analyseseriene, og alle var innenfor akseptkriteriet på $R^2 \geq 0,995$. Datamaterialet for forklaringskoeffisientene er vist i Vedlegg 23. Resultatene for %avvik er innenfor akseptkriteriet bortsett fra ved én prøve i én serie, STD 2_{blod} for perfenazin. Dette viser at det er kun én av tre serier som går utenfor kriteriet. Siden bare ett resultat lå like utenfor kriteriet, ble det i samhandling med veileder og medisinsk ansvarlig på AKF bestemt at resultatene kunne godkjennes.

4.2 Hvordan er metodens riktighet?

Resultatene fra undersøkelse av metodens riktighet viser at parallellene for alle analyttene er innenfor akseptertkriteriet, $\%CV \leq 15\%$. Perfenazin i fullblod viser generelt høyere %Bias enn de andre analyttene i fullblod, men de var likevel godt innenfor akseptkriteriene. Ut fra resultatene viser metoden en god riktighet og undersøkelsen kan dermed godkjennes.

4.3 Hvordan er metodens reproduserbarhet?

Resultatene fra undersøkelse av reproduserbarhet for LDN i fullblod viser at alle kontrollprøvene fikk beregnet %CV som lå godt innenfor akseptkriteriet på $\leq 20\%$. Resultatene for analytten flupentiksol viste noe høyere %CV enn analyttene perfenazin og zuklopentiksol, men lå innenfor akseptkriteriet. Perfenazin hadde gjennomsnittlig laveste %CV både i blod og serum. Resultatene fra undersøkelsen viste at den høyeste konsentrerte kontrollen, QC 3, hadde noe lavere %CV enn QC 2. Dette gjaldt for alle analyttene, bortsett fra flupentiksol. Resultatene viser derfor tendens til å være noe konsentrasjonsavhengig. Undersøkelsen viser at metodens reproduserbarhet er tilfredsstillende, og metoden har god presisjon mellom analyseseriene.

4.4 Hvordan er metodens repeterbarhet?

Resultatene fra undersøkelsen av metodens repeterbarhet viser at %CV for alle prøvene er innenfor akseptkriteriet på $\leq 10\%$. QC 3 med høyeste konsentrasjon viser noe lavere resultater. Dette gjaldt for alle analyttene, og resultatene viser derfor en liten tendens til å være konsentrasjonsavhengige. Resultatene for perfenazin var noe lavere enn resultatene for de to andre analyttene, og flupentiksol hadde de høyeste %CV-resultatene. Dette viser at metoden for LDN i fullblod har liten variasjon innen en analyseserie, og undersøkelsen for metodens repeterbarhet godkjennes.

4.5 Hvordan er metodens holdbarhet?

Resultatene fra analyse av ferdigopparbeidede prøver for metoden, viste god holdbarhet én dag (Dag 1) etter prøveopparbeidelsen, mens holdbarheten tre dager (Dag 3) etter prøveopparbeidelsen var ikke tilfredsstillende. Holdbarhetsanalysen ble først gjennomført for Dag 3, men én analytt hadde ett %avvik utenfor akseptkriteriet. Derfor ble det gjort en ny holdbarhetsanalyse for å undersøke om holdbarheten var god etter én dag.

Resultatene fra Dag 0 til Dag 1 viste at %avvikene lå godt innenfor akseptkriteriene på $\leq 15\%$ for QC og $\leq 20\%$ for prøver og standarder. Metodens holdbarhet anses dermed som tilfredsstillende ved én dags oppbevaring av ferdigopparbeidede prøver i kjøleskap ved 10°C .

Resultatene fra Dag 0 til Dag 3 viste at QC 2_{Blod} for flupentiksol var utenfor akseptkriteriet på $\leq 15\%$. Avviket var på 16,53%. De andre analyttene hadde alle %avvikene innenfor kriteriet. De fleste resultatverdiene viste konsentrasjonsøkninger fra Dag 0 til Dag 3. Det kan en se ved at få av %avvikene er negative. Perfenazin har kun negativt %avvik for ST 2_{Blod}, flupentiksol har ingen negative %avvik, mens zuklopentiksol har negativt %avvik på laveste standard og QC. At konsentrasjonen øker kan skyldes fordampning av løsemidler ved oppbevaring over lengre tid.

På grunnlag av at ett %avvik var utenfor kriteriene kunne ikke holdbarheten etter tre dager anses som tilfredsstillende. Undersøkelsen viser at ferdig opparbeidede prøver analysert tre dager etter prøveopparbeidelsen ikke vil gi pålitelige resultater. En kan kun godkjenne resultater analysert opp til én dag etter prøveopparbeidelsen.

4.5.1 Tin/frys

Resultatene fra tin/frys holdbarhetsanalyse viste at holdbarheten ved tining og frysing av prøvene benyttet i metoden, anses som tilfredsstillende. %avvikene fra REF-prøvene til TIN/FRYS-prøvene var alle godt innenfor akseptkriteriet på $\leq 20\%$. TIN/FRYS-prøvene ble tint og fryst tre ganger under forsøket. Prøver benyttet i metoden kan dermed tines og fryses minst tre ganger uten at det har betydelig innvirkning på resultatene.

4.6 Hvordan er metodens signal til støy-forhold

Resultatene fra undersøkelsen om S/N viser at alle S/N-forholdene ligger innenfor akseptkriteriene for kvantifiseringsionene og kvalifiseringsionene. Ved visuell vurdering viser kromatogrammene for analyttene en god separasjon og ingen tydelig interferens. Det gjaldt alle analyttene bortsett fra kvantifiseringsionet til zuklopentiksol som hadde litt interferens, som mulig kan ha påvirket S/N-forholdet og konsentrasjonsresultatet. S/N-forholdet ligger likevel innenfor akseptkriteriet.

Sammenligning av S/N-forholdene mellom ny metode og fullvalidert metode viste at resultatene i den nye metoden hadde lavere S/N-forhold enn den fullvaliderte metoden, men de stort sett var innenfor samme størrelsesorden. Kvalifiseringsionet til zuklopentiksol var det eneste som hadde S/N-forhold som var mye lavere enn S/N-forholdet til den fullvaliderte metoden. For flupentiksol var alle resultatene lavere, men de var likevel i cirka samme størrelsesorden.

Sammenligningene viser at det er lite interferens ved analysering i fullblod for den nye LDN-metoden. Det var én verdi som var langt utenfor ved sammenligning med den fullvaliderte metoden, men på grunn av at verdien var for et kvalifiseringsion har ikke dette stor betydning. Det er lavere krav til kvalifiseringsionet, da dette bare benyttes som en kontroll på at riktig analytt kvantifiseres under analysen.

Resultatene viser at forholdet mellom signal og støy under analyseringen er akseptabelt.

4.7 Hva blir metodens nedre kvantifiseringsgrense?

Resultatene fra bestemmelse av nedre kvantifiseringsgrense for metoden viser at STD 1 ikke kan godkjennes som nedre kvantifiseringsgrense. Dermed blir neste konsentrasjonsnivå; STD 2, gitt til å være nedre kvantifiseringsgrense.

STD 1 oppfylte ikke vurderingskriteriene for nedre kvantifiseringsgrense på flere nivå. S/N-kriteriene ble ikke innfridd da STD 1 havnet utenfor kriteriene for både kvantifiseringsionet og kvalifiseringsionet til flupentiksol i serum, og for kvalifiseringsionet til zuklopentiksol i serum. I blod lå alle S/N-verdiene innenfor kriteriene. Akseptkriteriene for S/N er ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet.

Kromatogrammene ble visuelt vurdert, og heller ikke her var resultatene optimale.

Kromatogrammene er vist i Vedlegg 20-21. Noen av kromatogrammene hadde lave topper på grunn av dårlig signal. Generelt viste kromatogrammene i blod lavere interferens enn kromatogrammene i serum. I serum viste alle kromatogrammene høy interferens, bortsett fra perfenazin.

S/N-forholdene skulle også vurderes opp mot arealene, som helst skulle være over 200.

Arealet for flupentiksol i serum var svært lavt og vil ikke gi pålitelige resultat, særlig siden S/N også er lavt.

%avvikene fra teoretisk verdi var heller ikke optimale, da alle verdier var utenfor akseptkriteriet på $\leq 20\%$. Resultatene viste %avvik opp til 84,56%, noe som tyder på at metoden har store vanskeligheter for riktig kvantifisering av lave verdier. I tillegg kom det ikke fram noe resultat for perfenazin. Prøvene ble reinjisert og avlest to ganger, men på grunn av dårlig signal greide ikke programmet å kvantifisere perfenazin noen av gangene. Dette kan tyde på at analytten var vanskelig å kvantifisere ved lave konsentrasjoner.

Ut ifra resultatene for S/N-verdiene og areal kommer det fram at verdiene for fullblod var innenfor akseptkriteriene, mens noen av verdiene i serum ikke var innenfor. Resultatene fra visuell vurdering av kromatogrammene viser også generelt bedre resultater for fullblod enn serum. Dette tyder på at fullblodsprøvene har lavere interferens enn serumprøvene.

Ingen av vurderingskriteriene ble innfridd, og STD 1 kunne ikke godkjennes som nedre kvantifiseringsgrense. STD 1 har konsentrasjonsnivåene 0,1 nmol/L for perfenazin og flupentiksol, og 1,0 nmol/L for zuklopentiksol. Neste konsentrasjonsnivå i standardrekken er STD 2, som er vurdert i avsnitt 4.5 om Signal/Støy, og ble godkjent. Konsentrasjonsnivåene her er 1,0 nmol for perfenazin og flupentiksol, og 5,0 nmol for zuklopentiksol. STD 2 blir dermed satt som nedre kvantifiseringsgrense for metoden.

5. Konklusjon

Undersøkelsene og de endelige resultatene ga følgende svar på problemstillingene:

Kan serum-standardkurver benyttes til kvantifisering av LDN-analyttene i fullblod/obduksjonsprøver?

Selv om ikke alle resultatene var innenfor akseptkriteriet ble det konkludert i samhandling med medisinsk ansvarlig ved AKF, med at standardkurver i serum kan benyttes i den nye metoden for LDN i fullblod.

Kan den nye analysemetoden for perfenazin, zuklopentiksol og flupentiksol godkjennes ut fra gitte kriterier, og kan proteinfelling erstatte væske-væske ekstraksjon i prøveopparbeidelsen for fullblodsprøver/obduksjonsprøver?

Den nye analysemetoden for LDN i fullblod kan godkjennes ut fra gode resultater ved undersøkelse av riktighet, reproduserbarhet, repeterbarhet og signal til støy-forhold. Ingen av undersøkelsene ga resultater som var utenfor akseptkriteriene. Derfor vil proteinfelling kunne erstatte væske-væske ekstraksjon som prøveopparbeidelse for LDN-prøver i fullblod.

Hvordan er holdbarheten for ferdigopparbeidede fullblodsprøver i LDN-analysen?

Undersøkelsen av holdbarhet viser at ferdigopparbeidede fullblodsprøver er holdbar opptil én dag i den nye LDN-metoden. I tillegg viser undersøkelsen av tin/frys at prøvene som benyttes til analysing av LDN i fullblod kan fryses og tines opp til tre ganger uten innvirkninger på resultatene.

Hva blir den nedre kvantifiseringsgrensen for LDN fullblodsprøver ved bruk av den nye analysemetoden?

STD 1 ble ikke godkjent som nedre kvantifiseringsgrense, på grunnlag av at resultatene fra undersøkelsen ikke var innenfor gitte kriterier. Nedre kvantifiseringsgrense ble da gitt til å være STD 2, med konsentrasjonene 1,0 nmol for perfenazin og flupentiksol, og 5,0 nmol for zuklopentiksol.

6. Kildehenvisning/referanser

Burtis, C. A. & Burns, D. E., 2014. Antipsychotic drugs. I: *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 7. red. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, p. 556.

Bye, G. T. & Roland, K. R., 2017. *EQS 23150; Tolkning av kromatogram fra TargetLynx*. Trondheim: St. Olavs Hospital.

Canadian Institute of Health Research, 2018. *DrugBank*. [Internett]

Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00875>

[Funnet 21 Mars 2019].

Canadian Institutes of Health Research, 2018. *DrugBank*. [Internett]

Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00850>

[Funnet 20 Mars 2019].

Canadian Institutes of Health Research, 2018. *DrugBank*. [Internett]

Available at: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01624>

[Funnet 16 Mars 2019].

Felleskatalogen AS, [Digitalisert bilde]. *Antipsykotika*. [Hentet 21. mars 2019]:

<https://www.felleskatalogen.no/medisin/formelregister/N05A>.

Greibrokk, T., Lundanes, E. & Rasmussen, K. E., 2005. Kromatografisk teori. I: *Kromatografi*. Oslo: Universitetsforlaget, pp. 6-24.

Greibrokk, T., Lundanes, E., Rasmussen, K. E. & Karlsen, J., 1994. Prøveopparbeidelse. I: *Kromatografi: separasjon og deteksjon*. Oslo: Universitetsforlaget, pp. 275-277.

Hansen, S. H. & Pedersen-Bjergaard, S., 2015. *Bioanalysis of pharmaceuticals*. 1. red. West Sussex: Wiley.

Hansen, S. H. & Pedersen-Bjergaard, S., 2015. Protein precipitation. I: *Bioanalysis of pharmaceuticals*. West Sussex: Wiley, p. 76.

Hilberg, T., 1999. Introduction. I: *Postmortem drug redistribution; extent mechanisms and implicatoin*s. Oslo: National Institute of Forensic Toxicology, pp. 7-15.

Kjøbli, E., 2017. *Kromatografi*. Trondheim: NTNU.

- Lie, M., 2017. *LC-MSMS i kliniske laboratorier*. Trondheim: St. Olavs Hospital.
- Michelsen, L. S., 2018. *Prøveopparbeidelse for kromatografiske analyser*. Trondheim: NITO.
- Norsk forening for klinisk farmakologi, 2015. *Farmakologiportalen*. [Internett]
Available at: <http://www.farmakologiportalen.no/content/2626/Serum-plasma-eller-fullblod>
[Funnet 02 04 2019].
- Norsk Helseinformatikk, 2013. *NHI.no*. [Internett]
Available at: <https://nhi.no/sykdommer/psykisk-helse/legemidler/antipsykotika/?page=all>
[Funnet 21 Mars 2019].
- Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll, 2002. *Validering/verifisering av klinisk kjemiske analyser*, Bergen: Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll.
- Norsk legemiddelhåndbok, 2015. *Norsk legemiddelhåndbok*. [Internett]
Available at: <https://www.legemiddelhandboka.no/legacy/chapter/L5.2>
[Funnet 21 03 2019].
- Nyberg, H. M., 2018. *EQS 23180; Metodebeskrivelse LDN i serum og fullblod*. Trondheim: St. Olavs Hospital.
- Rustad, P., 2001. Validering av analysekvalitet, Del 2. *Klinisk Kjemi i Norden*, Opplag nr. 2, pp. 12-17.
- Toronto Research Chemicals, 2013. *Certificate of analysis*. Toronto: s.n.
- TT, 2016. *Veieskjema LDN STD Stock*. Trondheim: St. Olavs Hospital, Avdeling for klinisk farmakologi.

7. Vedlegg

Vedlegg 1: Flytskjema LDN Fullblod	44-45
Vedlegg 2: Veieskjema LDN STD Stock	46
Vedlegg 3: Veieskjema LDN QC Stock	47
Vedlegg 4: Oppskrift bruksløsning LDN (flupentiksol og zuklopentiksol)	48
Vedlegg 5: Tillaging av ferdige kalibreringsstandarder og kontroller til LDN	49
Vedlegg 6: Rådatamaterialet for forsøk 0321HLDN_5	50-52
Vedlegg 7: Rådatamaterialet for forsøk 0325HLDN_6	53-54
Vedlegg 8: Rådatamaterialet for forsøk 0326HLDN_7	55-56
Vedlegg 9: Rådatamaterialet for forsøk 0327HLDN_8	57-58
Vedlegg 10: Rådatamaterialet for forsøk 0329HLDN_9	59-60
Vedlegg 11: Rådatamaterialet for forsøk 0329HLDN_9_b	61-62
Vedlegg 12: Rådatamaterialet for forsøk 0402HLDN_10	63-64
Vedlegg 13: Rådatamaterialet for forsøk 0402HLDN_10dag1	65-66
Vedlegg 14: Rådatamaterialet for forsøk 0411HLDN_11	67-68
Vedlegg 15: Beregningsmateriale, repeterbarhet	69
Vedlegg 16: Beregningsmateriale, reproduserbarhet og riktighet	70
Vedlegg 17: Beregningsmateriale, holdbarhet tin/frys	71
Vedlegg 18: Rådata, signal til støy i serum	72
Vedlegg 19: Rådata, signal til støy i fullblod	73
Vedlegg 20: Rådata, signal til støy i fullvalidert metode (serum)	74
Vedlegg 21: Rådata, signal til støy for STD 1 i serum	75
Vedlegg 22: Rådata, signal til støy for STD 1 i fullblod	76
Vedlegg 23: Datamaterialet for forklaringskoeffisienten ved serum standardkurve.....	77

Vedlegg 1: Flytskjema LDN Fullblod

Flytskjema LDN Fullblod

Start med å slå på forseglingsmaskin

Pipetter 100 µl standard/kontroll over i eppendorfrør.

↓
Tilsett 25 µl LDN-IS
50 % MeOH i H₂O
(Perfenazin-d₄: 10 ng/ml
Flupentiksol-d₄: 20 ng/ml
Zuklopentiksol-d₄: 200 ng/ml)

↓
Mikses med whirlmikser (ca 3 s)

↓
Tilsett 375 µl ACN (iskald, rett fra fryser) i to eppendorfrør av gangen, korkes og mikses umiddelbart på whirlmikser i ca. 15 s

↓
Sentrifuger (11000 rpm i 3 min på Hettich sentrifuge.)

↓
Hell supernatanten over i ekstraksjonsglass (tt-rør)

Beskrivelse	Prøve/reagenser/utstyr	Volum	Posisjon Hamilton
Prøveblanding	Std/QC (tt-rør)	500 µl	Spor 46, pos 1-8
	Prøver (tt-rør)	500 µl	Spor 51 – 54
Filtreringsplate	Ostro™ 96-brønnsplate		Spor 39, pos 4 (Plasseres oppå en mikrotiterplate)
Engangsspisser (Std/QC, prøver)	MiStar 1000 µl standard volum spiss uten filter		Spor 21 og 27, pos 1

NB! Rackene med pasientprøver, Ostro-platen og spisser skal være dratt ut før start for lesing av barcode. De trekkes automatisk inn.

↓
PPP

↓
Inndamping på Ultravap Sample Concentrator, program 2 (40°C i 40 min)

Beskrivelse	Prøve/reagenser/utstyr	Volum	Posisjon TECAN A	Posisjon TECAN C
Tilsetting av reløsnings-reagens	Analyseplate (Waters 2 ml 96-dyppbrennsplate)		Grid 48-4	Grid 17-4
	Engangsspisser DiTi 200 µl		Grid 64-2 Site 16	Grid 1-1 Site 15
	30 % MeOH i H ₂ O	400 µl	Grid 56-2	Grid 25-2

Brønnplaten sveises med aluminiumsfolie (2*(170°C, 2 s))
 Rull over den sveisede brønnplaten 3-4 ganger
 Rutemønsteret skal vises på alle brønner. Sjekk hjørner og langsider.



Brønnplaten mikses på Co-Mix Multifomat (2100 rpm, 1 min)



Settes i autosampler på LC-MSMS (10°C) for analyse

Robotscript

Robot	Script	Utfører
Hamilton ML Star	LDN_vx_x*	
Tecan	LDN_S_relosning_TecAx	Tilsetter
	LDN_S_relosning_TecCx	relosningsreagens

Instrumentinformasjon

Beskrivelse	Innstillinger
Metode	LDN_S_x
Analyseinstrument	LC-MSMS H (E)
Mobilfaser	A1: 5 mM NH ₄ -format, pH 10,1 B1: MeOH
Injeksjonsvolum	8,0 µl
Run-tid	2,0 min
Tolkningsmetode	LDN_S_Tolkx

(x=versionsnr.)

Vedlegg 2: Veieskjema LDN STD Stock

Avdeling for klinisk farmakologi

St.Olavs Hospital

HELSE MIDT-NORGE

Veieskjema LDN STD Stock

Analytt		"Analyttforbindelse"			Kons. mM	Volum (ml)	Innveing (mg)	Løsemiddel
Navn	MW (g/mol)	Navn	MW (g/mol)	Renhet (x%/100)				
Flupentiksol	434,5	Flupentiksol 2HCl	507,4	1,000	1	10	5,07	MeOH
Perfenazin	404,0	Perfenazin	404,0	0,968	1	10	4,17	MeOH
Zuklopentiksol	401,0	Zuklopentiksol 2HCl	473,9	0,998	1	10	4,75	MeOH

Innveing:	Lot nr.	Leverandør	STD	Batch	Dato / Sign	Kommentar
Flupentiksol	1391	Lundbeck				Mangler sertifikat. Se dokumentasjon: 05.10.16
Perfenazin	10 879	Chiron				
Zuklopentiksol	1521	Lundbeck				Renstoff fra en leverandør, ulik lot. Se dokumentasjon

Veieskjema lagres under I\kalib.lab\veieskjema\utfylte veieskjema\finn riktig mappe\lagres under stock.

Navnet på veieskjemaet skal være navn på analytt(er) og dato for innveing.

Husk å skrivebeskytte regnearket.

Stock må logføres i batchlogg.

Gyldig fra: 21.10.16 Sign: TT

Utgitt av: AD 05.10.16

Vedlegg 3: Veieskjema LDN QC Stock

Avdeling for klinisk farmakologi

St.Olavs Hospital



Veieskjema LDN QC Stock								
Analytt		"Analyttforbindelse"			Kons. mM	Volum (ml)	Innveiging (mg)	Løsemiddel
Navn	MW (g/mol)	Navn	MW (g/mol)	Renhet (x%/100)				
Flupentiksol	434,5	Flupentiksol 2HCl	507,4	0,994	1	10	5,11	MeOH
Perfenazin	404,0	Perfenazin	404,0	1,000	1	10	4,04	MeOH
Zuklopentiksol	401,0	Zuklopentiksol 2HCl	474,0	0,973	1	10	4,87	MeOH
Innveiging:	Lot nr.	Leverandør	QC	Batch	Dato / Sign		Kommentar	
Flupentiksol	010M4735V	Sigma Aldrich						
Perfenazin	071M1248V	Sigma Aldrich						
Zuklopentiksol	2125793	Lundbeck					Renstoff fra en leverandør, ulik lot. Se dokumentasjon	

Veieskjema lagres under \\kalib.lab\veieskjema\utfylte veieskjema\finn riktig mappelagres under stock.
 Navnet på veieskjemaet skal være navn på analytt(er) og dato for innveiging.
 Husk å skrivebeskytte regnearket.
 Stock må logføres i batchlogg.

Gyldig fra: 21.10.16 Sign: TT

Utgitt av: AD 05.10.16

Vedlegg 4: Oppskrift bruksløsning LDN (Flupentixol og Zuklopentixol)

Bruksløsning LDN (Flupentixol og Zuklopentixol)

Det lages ikke Bruksløsninger til Perfenazin pga dårlig holdbarhet i Bruksløsning. Det lages semistocker som tilsettes direkte i serum.

På grunn av lave konsentrasjoner på Flupentiksol lages det semistocker (en til STD og en til QC) på denne analytten. Det lages ny semistock før hver tillaging av bruksløsning.

Tillaging av semistock (en til STD og en til QC):

Analytt	Stock (mM)	Semistock (mM)
		0,01
		Volum (µl)
Flupentiksol	1	100
MeOH (ml)		10

Tillaging av bruksløsninger:

Analytt	Stock (mM)	Semi-stock (mM)	STD1 (µM)		STD2 (µM)		STD3 (µM)		STD4 (µM)	
			0,01	0,1	0,1	0,5	0,5	5	3,0	20
			Volum (µl)		Volum (µl)		Volum (µl)		Volum (µl)	
Flupentiksol	1	0,01	100		500		500		3000	
Zuklopentiksol	1			10		25		50		200
MeOH (ml)			100		50		10		10	

Analytt	Stock (mM)	Semi-stock (mM)	QC1 (µM)		QC2 (µM)		QC3 (µM)	
			0,02	0,2	0,5	2,5	2,5	15
			Volum (µl)		Volum (µl)		Volum (µl)	
Flupentiksol	1	0,01	200		500		2500	
Zuklopentiksol	1			20		25		150
MeOH (ml)			100		10		10	

Vedlegg 5: Tillaging av ferdige kalibreringsstandarder og kontroller til LDN

Tillaging av ferdige kalibreringsstandarder og kontroller til LDN

0-serum som skal benyttes kontrolleres for spor av analyttene.

Det benyttes bruksløsning LDN og Semistock Perfenazin til disse rekkene

Det benyttes ikke Bruksløsning til Perfenazin pga dårlig holdbarhet i Bruksløsning. Se tabell under for tilsetning av semistock i serum.

Det lages ny semistock før hver tillaging av ferdiglaget materiale

Bruksløsning LDN til metoden er lagd slik at en 1% fortynning av disse i ønsket matriks, gir ønsket matrikkskonsentrasjon.

(eks. 100 µl bruksl. til 10 ml serum = ønsket matrikkskonsentrasjon)

Tillaging av semistock (en til STD og en til QC):

Analytt	Stock (mM)	Semistock (nM)
		1000
		Volum (µl)
Perfenazin	1	10
MeOH (ml)		10

Ferdige standarder og kontroller fordeles. **Serumrekker** fordeles i porsjoner i matriksrør, se batchlogg for volum. **Blodrekker** fordeles med 500 µl i rundbunnede glass

Tillaging av STD / QC-rekker: Til blod benyttes STD2 - STD4 og QC2 og QC3

Bruksl.	Semistock (nM)	STD1 (µl)	STD2 (µl)	STD3 (µl)	STD4 (µl)
Kons. av Perf i ferdiglaget materiale (nM)		0,1	1	5	30
Perfenazin Semistock	1000	5	10	50	300
LDN (Flup + Zuklo) Bruksløsning		500	100	100	100
0-serum (ml)		50	10	10	10

Bruksl.	Semistock (nM)	QC1 (µl)	QC2 (µl)	QC3 (µl)
Kons. av Perf i ferdiglaget materiale (nM)		0,2	5	25
Perfenazin Semistock	1000	10	50	250
LDN (Flup + Zuklo) Bruksløsning		500	100	100
0-serum (ml)		50	10	10

Vedlegg 6: Rådatamaterialet for forsøk 0321HLDN_5

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1] Area	IS Area	IS RT	Response
1	0321HLDN_5_01	Std0	Blank									
2	0321HLDN_5_02	Std0	Blank							27549	1,13	
3	0321HLDN_5_03	Std0	Blank							31914	1,13	
4	0321HLDN_5_04	Std2	QC	1	1,05	5,49	1,13	9823	6313	40551	1,12	0,242
5	0321HLDN_5_05	Std3	QC	5	4,91	-1,86	1,13	32160	22676	36098	1,12	0,891
6	0321HLDN_5_06	Std4	QC	30	29,44	-1,87	1,12	127522	86507	25101	1,12	5,08
7	0321HLDN_5_07	Std0	Blank				1,21	29	6	36636	1,12	0,001
8	0321HLDN_5_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,79	-4,18	1,12	35659	24563	40924	1,12	0,871
9	0321HLDN_5_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	23,73	-5,1	1,12	133379	89925	32564	1,12	4,096
10	0321HLDN_5_10	ST0 B					1,13	60	14	49396	1,12	0,001
11	0321HLDN_5_11	ST2 B	QC	1	1,1	9,58	1,12	14691	10405	58970	1,12	0,249
12	0321HLDN_5_12	ST3 B	QC	5	5,35	6,95	1,12	57858	39549	59942	1,12	0,965
13	0321HLDN_5_13	ST4 B	QC	30	24,09	-19,69	1,12	184158	127921	44279	1,12	4,159
14	0321HLDN_5_14	ST0 B	QC	0			1,13	141	28	48894	1,12	0,003
15	0321HLDN_5_15	QC2 B	QC	5	5,16	3,18	1,12	55853	38302	59839	1,12	0,933
16	0321HLDN_5_16	QC3 B	QC	25	26,1	4,4	1,12	265250	183325	58884	1,12	4,505
17	0321HLDN_5_17	ST0 S NY	QC	0			1,14	68	23	43992	1,12	0,002
18	0321HLDN_5_18	ST2 S NY	Standard	1	1	0	1,12	8636	5809	37060	1,12	0,233
19	0321HLDN_5_19	ST3 S NY	Standard	5	5	0	1,12	34015	24007	37520	1,12	0,907
20	0321HLDN_5_20	ST4 S NY	Standard	30	30	0	1,12	180246	125098	34813	1,12	5,178
21	0321HLDN_5_21	ST0 S NY	QC	0			1,14	20	46	43889	1,12	0
22	0321HLDN_5_22	QC2 S NY	QC	5	4,68	-6,4	1,12	28376	19550	33283	1,12	0,853
23	0321HLDN_5_23	QC3 S NY	QC	25	24,37	-2,53	1,12	87166	60479	20723	1,12	4,206
24	0321HLDN_5_24	ST0 B NY								54147	1,12	
25	0321HLDN_5_25	ST2 B NY	QC	1	1,16	16,29	1,12	14557	10197	55901	1,12	0,26
26	0321HLDN_5_26	ST3 B NY	QC	5	5,51	10,26	1,12	58985	41042	59393	1,12	0,993
27	0321HLDN_5_27	ST4 B NY	QC	30	31,74	5,79	1,12	330264	230414	60284	1,12	5,478
28	0321HLDN_5_28	ST0 B NY					1,13	88	49	56125	1,12	0,002
29	0321HLDN_5_29	QC2 B NY	QC	5	5,32	6,4	1,12	53409	35882	55600	1,12	0,961
30	0321HLDN_5_30	QC3 B NY	QC	25	15,79	-36,84	1,12	160639	111473	58692	1,12	2,737
31	0321HLDN_5_31	qcDLN_B_PRO			4,85		1,12	35992	24782	40802	1,12	0,882

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ¹ Area	IS Area	IS RT	Response
1	0321HLDN_5_01	Std0	Blank									
2	0321HLDN_5_02	Std0	Blank							21719	1,2	
3	0321HLDN_5_03	Std0	Blank							23820	1,2	
4	0321HLDN_5_04	Std2	QC	1	0,99	-1,24	1,2	1584	3597	33632	1,19	0,154
5	0321HLDN_5_05	Std3	QC	5	5,26	5,15	1,19	6628	15435	29075	1,19	0,759
6	0321HLDN_5_06	Std4	QC	30	31,86	6,21	1,19	21611	53726	15708	1,19	4,796
7	0321HLDN_5_07	Std0	Blank				1,19	20	14	29780	1,19	0,001
8	0321HLDN_5_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,32	6,33	1,19	7080	17549	32099	1,19	0,767
9	0321HLDN_5_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	27,45	9,79	1,19	24460	62632	21274	1,19	4,094
10	0321HLDN_5_10	STO B					1,2	20	28	39546	1,19	0,001
11	0321HLDN_5_11	ST2 B	QC	1	0,99	-1,22	1,19	2264	5721	51825	1,19	0,154
12	0321HLDN_5_12	ST3 B	QC	5	5,78	15,67	1,19	11535	29132	48752	1,19	0,834
13	0321HLDN_5_13	ST4 B	QC	30	32,9	9,67	1,19	44756	111149	31413	1,19	4,963
14	0321HLDN_5_14	STO B	QC	0						42835	1,19	
15	0321HLDN_5_15	QC2 B	QC	5	5,56	11,18	1,19	11011	28268	48978	1,19	0,802
16	0321HLDN_5_16	QC3 B	QC	25	26,75	7	1,19	51057	129495	45318	1,19	3,984
17	0321HLDN_5_17	STO S NY	QC	0						39163	1,19	
18	0321HLDN_5_18	ST2 S NY	Standard	1	1	0	1,19	1431	3520	31775	1,19	0,156
19	0321HLDN_5_19	ST3 S NY	Standard	5	5	0	1,19	6629	16579	32143	1,19	0,722
20	0321HLDN_5_20	ST4 S NY	Standard	30	30	0	1,19	33978	82183	25823	1,19	4,498
21	0321HLDN_5_21	STO S NY	QC	0						39880	1,19	
22	0321HLDN_5_22	QC2 S NY	QC	5	5,21	4,11	1,19	5725	14658	27126	1,19	0,751
23	0321HLDN_5_23	QC3 S NY	QC	25	27,13	8,52	1,19	15161	39348	13479	1,19	4,044
24	0321HLDN_5_24	STO B NY								44344	1,19	
25	0321HLDN_5_25	ST2 B NY	QC	1	0,99	-1,46	1,19	2228	5417	49728	1,19	0,154
26	0321HLDN_5_26	ST3 B NY	QC	5	5,55	10,98	1,19	11093	27365	48040	1,19	0,801
27	0321HLDN_5_27	ST4 B NY	QC	30	32,42	8,06	1,19	65004	162044	46475	1,19	4,885
28	0321HLDN_5_28	STO B NY					1,27	24	6	45425	1,19	0,001
29	0321HLDN_5_29	QC2 B NY	QC	5	5,78	15,59	1,19	10531	27209	45274	1,19	0,834
30	0321HLDN_5_30	QC3 B NY	QC	25	26,44	5,75	1,19	50302	128080	45332	1,19	3,935
31	0321HLDN_5_31	qcDLN_B_PRO			5,45		1,19	7013	17559	31243	1,19	0,786

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1] Area	IS Area	IS RT	Response
1	0321HLDN_5_01	Std0	Blank									
2	0321HLDN_5_02	Std0	Blank							92247	1,17	
3	0321HLDN_5_03	Std0	Blank							98965	1,17	
4	0321HLDN_5_04	Std2	QC	5	5,22	4,31	1,17	9787	8519	141985	1,17	0,069
5	0321HLDN_5_05	Std3	QC	50	52,77	5,54	1,17	78721	68729	119629	1,16	0,658
6	0321HLDN_5_06	Std4	QC	200	203,32	1,66	1,17	187080	167444	71337	1,16	2,622
7	0321HLDN_5_07	Std0	Blank							120425	1,16	
8	0321HLDN_5_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	25,05	0,2	1,17	42350	37685	135381	1,16	0,313
9	0321HLDN_5_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	151,44	0,96	1,17	185612	165611	96244	1,16	1,929
10	0321HLDN_5_10	ST0 B								176309	1,16	
11	0321HLDN_5_11	ST2 B	QC	5	5,24	4,8	1,17	14590	12834	210748	1,16	0,069
12	0321HLDN_5_12	ST3 B	QC	50	53,74	7,48	1,17	142877	125635	213183	1,16	0,67
13	0321HLDN_5_13	ST4 B	QC	200	198,6	-0,7	1,17	371683	333678	145266	1,16	2,559
14	0321HLDN_5_14	ST0 B	QC	0						177359	1,16	
15	0321HLDN_5_15	QC2 B	QC	25	26,58	6,34	1,17	68285	60112	205808	1,16	0,332
16	0321HLDN_5_16	QC3 B	QC	150	155,88	3,92	1,17	390773	342016	196638	1,16	1,987
17	0321HLDN_5_17	ST0 S NY	QC	0						153871	1,16	
18	0321HLDN_5_18	ST2 S NY	Standard	5	5	0	1,17	8637	7720	130278	1,16	0,066
19	0321HLDN_5_19	ST3 S NY	Standard	50	50	0	1,17	79332	69484	127271	1,16	0,623
20	0321HLDN_5_20	ST4 S NY	Standard	200	200	0	1,17	282306	249263	109523	1,16	2,578
21	0321HLDN_5_21	ST0 S NY	QC	0						153008	1,16	
22	0321HLDN_5_22	QC2 S NY	QC	25	25,05	0,21	1,17	34541	30810	110403	1,16	0,313
23	0321HLDN_5_23	QC3 S NY	QC	150	157,16	4,77	1,17	120804	106008	60277	1,16	2,004
24	0321HLDN_5_24	ST0 B NY								191359	1,16	
25	0321HLDN_5_25	ST2 B NY	QC	5	5,14	2,86	1,17	13127	11652	192901	1,16	0,068
26	0321HLDN_5_26	ST3 B NY	QC	50	53,76	7,52	1,17	135235	118458	201691	1,16	0,671
27	0321HLDN_5_27	ST4 B NY	QC	200	209,2	4,6	1,17	519083	456545	192089	1,16	2,702
28	0321HLDN_5_28	ST0 B NY								194877	1,16	
29	0321HLDN_5_29	QC2 B NY	QC	25	27,39	9,55	1,17	65311	57180	191121	1,16	0,342
30	0321HLDN_5_30	QC3 B NY	QC	150	159,18	6,12	1,17	386107	342007	190112	1,16	2,031
31	0321HLDN_5_31	qcDLDN_B_PRO			25,89		1,17	42913	37524	132761	1,16	0,323

Vedlegg 7: Rådatamaterialet for forsøk 0325HLDN_6

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ¹ Area	IS Area	IS RT	Response
1	0325HLDN_6_01	Std0	Blank									
2	0325HLDN_6_02	Std0	Blank							15202	1,15	
3	0325HLDN_6_03	Std0	Blank							17356	1,16	
4	0325HLDN_6_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	2876	1986	14255	1,16	0,202
5	0325HLDN_6_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	11818	7484	14428	1,15	0,819
6	0325HLDN_6_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	61372	39056	13143	1,15	4,67
7	0325HLDN_6_07	Std0	Blank							19163	1,15	
8	0325HLDN_6_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5	0,06	1,16	11690	7508	14263	1,15	0,82
9	0325HLDN_6_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,6	-1,6	1,16	74156	48000	19315	1,15	3,839
10	0325HLDN_6_10	ST 0 B	Blank							49101	1,15	
11	0325HLDN_6_11	ST 2 B	QC	1	1,21	21,35	1,16	13354	8301	56904	1,15	0,235
12	0325HLDN_6_12	ST 3 B	QC	5	5,46	9,12	1,16	60494	39268	68013	1,15	0,889
13	0325HLDN_6_13	ST 4 B	QC	30	30,77	2,58	1,16	341013	221229	71215	1,15	4,789
14	0325HLDN_6_14	ST 0 B	Blank							50577	1,15	
15	0325HLDN_6_15	QC 2 B	QC	5	5,56	11,11	1,16	79551	51161	87922	1,15	0,905
16	0325HLDN_6_16	QC 3 B	QC	25	26,87	7,48	1,16	315664	207582	75368	1,15	4,188
17	0325HLDN_6_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,13	2,6	1,16	15875	10561	18918	1,15	0,839

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ¹ Area	IS Area	IS RT	Response
1	0325HLDN_6_01	Std0	Blank									
2	0325HLDN_6_02	Std0	Blank		0,06		1,3	14	8	6760	1,22	0,003
3	0325HLDN_6_03	Std0	Blank		0,05		1,15	3	16	7356	1,22	0,003
4	0325HLDN_6_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	290	695	6290	1,22	0,157
5	0325HLDN_6_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	1570	3666	6496	1,22	0,806
6	0325HLDN_6_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	7681	18012	5270	1,22	4,875
7	0325HLDN_6_07	Std0	Blank		0,08		1,19	11	53	8276	1,22	0,008
8	0325HLDN_6_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,33	6,53	1,22	1642	3864	6409	1,22	0,859
9	0325HLDN_6_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	26,32	5,27	1,22	9957	24283	8010	1,22	4,274
10	0325HLDN_6_10	ST 0 B	Blank		0,04		1,24	1	11	28441	1,22	0
11	0325HLDN_6_11	ST 2 B	QC	1	1,01	0,82	1,22	1583	3632	33030	1,22	0,158
12	0325HLDN_6_12	ST 3 B	QC	5	4,87	-2,63	1,22	9513	22691	41040	1,22	0,785
13	0325HLDN_6_13	ST 4 B	QC	30	28,14	-6,19	1,22	57134	133446	41683	1,22	4,572
14	0325HLDN_6_14	ST 0 B	Blank		0,05		1,21	20	47	30625	1,22	0,002
15	0325HLDN_6_15	QC 2 B	QC	5	5,21	4,27	1,22	13817	34320	57259	1,22	0,841
16	0325HLDN_6_16	QC 3 B	QC	25	24,95	-0,2	1,22	51345	125863	43737	1,22	4,052
17	0325HLDN_6_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,38	7,64	1,22	2417	5940	9627	1,22	0,868

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0325HLDN_6_01	Std0	Blank									
2	0325HLDN_6_02	Std0	Blank							35330	1,19	
3	0325HLDN_6_03	Std0	Blank							42696	1,2	
4	0325HLDN_6_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	2141	1717	33779	1,19	0,063
5	0325HLDN_6_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	22542	18034	37722	1,19	0,598
6	0325HLDN_6_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	76652	61235	32074	1,19	2,39
7	0325HLDN_6_07	Std0	Blank							50464	1,19	
8	0325HLDN_6_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	23,67	-5,33	1,2	10895	9053	38259	1,19	0,285
9	0325HLDN_6_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	148,79	-0,81	1,2	86859	70302	48907	1,19	1,776
10	0325HLDN_6_10	ST 0 B	Blank							154102	1,19	
11	0325HLDN_6_11	ST 2 B	QC	5	4,81	-3,82	1,2	10823	8852	177129	1,19	0,061
12	0325HLDN_6_12	ST 3 B	QC	50	48,92	-2,17	1,2	123571	101211	211342	1,19	0,585
13	0325HLDN_6_13	ST 4 B	QC	200	195,49	-2,26	1,2	483858	397814	207158	1,19	2,336
14	0325HLDN_6_14	ST 0 B	Blank							163662	1,19	
15	0325HLDN_6_15	QC 2 B	QC	25	24,53	-1,87	1,2	85636	69879	290236	1,19	0,295
16	0325HLDN_6_16	QC 3 B	QC	150	152,61	1,74	1,2	407193	337624	223526	1,19	1,822
17	0325HLDN_6_17	qcDLN_B_PRO	QC	25	23,88	-4,48	1,2	15515	12549	54001	1,19	0,287

Vedlegg 8: Rådatamaterialet for forsøk 0326HLDN_7

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ² Area	IS Area	IS RT	Response
1	0326HLDN_7_01	Std0	Blank							30031	1,15	
2	0326HLDN_7_02	Std2	Standard	1	1	0	1,16	7353	5038	34530	1,16	0,213
3	0326HLDN_7_03	Std3	Standard	5	5	0	1,16	29187	19046	34133	1,15	0,855
4	0326HLDN_7_04	Std4	Standard	30	30	0	1,16	161108	105969	33652	1,15	4,788
5	0326HLDN_7_05	Std0	Blank							31006	1,16	
6	0326HLDN_7_06	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,72	-5,54	1,16	21171	13746	26112	1,15	0,811
7	0326HLDN_7_07	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,97	-0,11	1,16	138285	90610	34504	1,15	4,008
8	0326HLDN_7_08	ST 0 B	Blank							58332	1,15	
9	0326HLDN_7_09	ST 2 B	QC	1	1,19	18,74	1,16	18760	11963	77170	1,15	0,243
10	0326HLDN_7_10	ST 3 B	QC	5	5,31	6,1	1,16	58637	38320	64870	1,15	0,904
11	0326HLDN_7_11	ST 4 B	QC	30	30,71	2,35	1,16	321701	211877	65700	1,15	4,897
12	0326HLDN_7_12	ST 0 B	Blank				1,16	69	16	58794	1,15	0,001
13	0326HLDN_7_13	QC 2 B	QC	5	5,2	4,01	1,16	72957	47819	82232	1,15	0,887
14	0326HLDN_7_14	QC 3 B	QC	25	26,25	5,01	1,16	313923	207369	74617	1,15	4,207
15	0326HLDN_7_15	qcDLN_B_PRO	QC	5	4,64	-7,26	1,16	20268	13165	25433	1,15	0,797

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ² Area	IS Area	IS RT	Response
1	0326HLDN_7_01	Std0	Blank				1,25	18	122	13813	1,22	0,01
2	0326HLDN_7_02	Std2	Standard	1	1	0	1,22	929	2391	19633	1,22	0,169
3	0326HLDN_7_03	Std3	Standard	5	5	0	1,22	4520	10553	19501	1,22	0,773
4	0326HLDN_7_04	Std4	Standard	30	30	0	1,22	25000	60145	17781	1,22	4,789
5	0326HLDN_7_05	Std0	Blank							17414	1,22	
6	0326HLDN_7_06	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,31	6,17	1,22	3403	7858	13734	1,22	0,82
7	0326HLDN_7_07	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,83	-0,67	1,22	22737	56189	20111	1,22	3,924
8	0326HLDN_7_08	ST 0 B	Blank							41385	1,22	
9	0326HLDN_7_09	ST 2 B	QC	1	0,88	-12,07	1,22	2522	6009	56482	1,22	0,151
10	0326HLDN_7_10	ST 3 B	QC	5	4,85	-2,98	1,22	9411	22903	43068	1,22	0,75
11	0326HLDN_7_11	ST 4 B	QC	30	28,46	-5,13	1,22	56590	133419	41950	1,22	4,529
12	0326HLDN_7_12	ST 0 B	Blank				1,23	19	11	43714	1,22	0,001
13	0326HLDN_7_13	QC 2 B	QC	5	5,28	5,67	1,22	13931	32932	57419	1,22	0,816
14	0326HLDN_7_14	QC 3 B	QC	25	25,36	1,43	1,22	53052	129029	45390	1,22	4,011
15	0326HLDN_7_15	qcDLN_B_PRO	QC	5	4,85	-3	1,22	3249	7871	14824	1,22	0,75

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1] Area	IS Area	IS RT	Response
1	0326HLDN_7_re	Std0	Blank							74754	1,19	
2	0326HLDN_7_re	Std2	Standard	5	5	0	1,2	5980	5272	100842	1,19	0,059
3	0326HLDN_7_re	Std3	Standard	50	50	0	1,2	56433	45811	100151	1,19	0,563
4	0326HLDN_7_re	Std4	Standard	200	200	0	1,2	218002	179113	92608	1,19	2,354
5	0326HLDN_7_re	Std0	Blank							94851	1,19	
6	0326HLDN_7_re	qc2LDN_B_PRO	QC	25	23,84	-4,66	1,2	20520	17210	76430	1,19	0,268
7	0326HLDN_7_re	qc3LDN_B_PRO	QC	150	151,93	1,29	1,2	177440	147010	100715	1,19	1,762
8	0326HLDN_7_re	ST 0 B	Blank							202259	1,19	
9	0326HLDN_7_re	ST 2 B	QC	5	5,04	0,71	1,2	15946	13026	267135	1,19	0,06
10	0326HLDN_7_re	ST 3 B	QC	50	49,15	-1,7	1,2	119054	99015	214973	1,19	0,554
11	0326HLDN_7_re	ST 4 B	QC	200	199,08	-0,46	1,2	466360	381639	199084	1,19	2,343
12	0326HLDN_7_re	ST 0 B	Blank							201924	1,19	
13	0326HLDN_7_re	QC 2 B	QC	25	26,01	4,05	1,2	79843	66076	272667	1,19	0,293
14	0326HLDN_7_re	QC 3 B	QC	150	157,71	5,14	1,2	412921	341224	225379	1,19	1,832
15	0326HLDN_7_re	qcDLN_B_PRO	QC	25	23,34	-6,66	1,2	19976	16790	75983	1,19	0,263

Vedlegg 9: Rådatamaterialet for forsøk 0327HLDN_8

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	b Area	IS Area	IS RT	Response
1	0327HLDN_8_01	Std0	Blank									
2	0327HLDN_8_02	Std0	Blank				1,16	19	2	17036	1,17	0,001
3	0327HLDN_8_03	Std0	Blank				1,18	11	5	30970	1,16	0
4	0327HLDN_8_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	5648	3488	26197	1,16	0,216
5	0327HLDN_8_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	16747	11106	20216	1,15	0,828
6	0327HLDN_8_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	100705	66264	21454	1,15	4,694
7	0327HLDN_8_07	Std0	Blank				1,16	46	85	23561	1,15	0,002
8	0327HLDN_8_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,84	-3,25	1,16	19847	12626	24702	1,15	0,803
9	0327HLDN_8_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,72	-1,12	1,16	124668	81526	32195	1,15	3,872
10	0327HLDN_8_10	ST 0 B	Blank				1,16	66	56	48552	1,15	0,001
11	0327HLDN_8_11	ST 2 B	QC	1	1,13	12,94	1,16	10523	6755	44702	1,15	0,235
12	0327HLDN_8_12	ST 3 B	QC	5	5,36	7,19	1,16	44530	29198	50403	1,15	0,883
13	0327HLDN_8_13	ST 4 B	QC	30	31,15	3,82	1,16	357896	233528	73449	1,15	4,873
14	0327HLDN_8_14	ST 0 B	Blank				1,16	141	41	47544	1,15	0,003
15	0327HLDN_8_15	QC 2 B1	QC	5	5,58	11,57	1,15	61780	39844	67364	1,15	0,917
16	0327HLDN_8_16	QC 3 B1	QC	25	26,43	5,73	1,15	319238	208699	77138	1,15	4,139
17	0327HLDN_8_17	QC 2 B2	QC	5	5,51	10,19	1,15	66572	43009	73433	1,15	0,907
18	0327HLDN_8_18	QC 3 B2	QC	25	26,51	6,04	1,15	320353	208336	77181	1,15	4,151
19	0327HLDN_8_19	QC 2 B3	QC	5	5,34	6,78	1,16	60312	38374	68506	1,15	0,88
20	0327HLDN_8_20	QC 3 B3	QC	25	26,59	6,36	1,15	330764	216815	79453	1,15	4,163
21	0327HLDN_8_21	QC 2 B4	QC	5	5,42	8,48	1,16	50082	32290	56055	1,15	0,893
22	0327HLDN_8_22	QC 3 B4	QC	25	26,33	5,34	1,15	289779	190269	70277	1,15	4,123
23	0327HLDN_8_23	QC 2 B5	QC	5	5,47	9,35	1,15	64336	42196	71477	1,15	0,9
24	0327HLDN_8_24	QC 3 B5	QC	25	26,59	6,34	1,16	324155	214462	77876	1,15	4,162
25	0327HLDN_8_25	QC 2 B6	QC	5	5,45	8,96	1,15	63320	41207	70582	1,15	0,897
26	0327HLDN_8_26	QC 3 B6	QC	25	26,89	7,55	1,15	278520	185131	66164	1,15	4,21
27	0327HLDN_8_27	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,01	0,18	1,16	40749	26107	49111	1,15	0,83

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	b Area	IS Area	IS RT	Response
1	0327HLDN_8_01	Std0	Blank									
2	0327HLDN_8_02	Std0	Blank				1,18	13	7	8198	1,23	0,003
3	0327HLDN_8_03	Std0	Blank							17470	1,23	
4	0327HLDN_8_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	804	1904	14124	1,22	0,192
5	0327HLDN_8_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	2397	5593	10025	1,22	0,797
6	0327HLDN_8_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	14662	34475	9811	1,22	5,008
7	0327HLDN_8_07	Std0	Blank							11829	1,22	
8	0327HLDN_8_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,45	9,09	1,22	3127	7883	12697	1,22	0,867
9	0327HLDN_8_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	26,07	4,3	1,22	20747	50456	16565	1,22	4,298
10	0327HLDN_8_10	ST 0 B	Blank				1,24	16	66	29239	1,22	0,003
11	0327HLDN_8_11	ST 2 B	QC	1	0,86	-14,4	1,22	1208	2940	24365	1,22	0,17
12	0327HLDN_8_12	ST 3 B	QC	5	5,03	0,52	1,22	6686	15895	28189	1,22	0,801
13	0327HLDN_8_13	ST 4 B	QC	30	28,98	-3,39	1,22	69808	166360	48973	1,22	4,822
14	0327HLDN_8_14	ST 0 B	Blank				1,21	38	65	29300	1,22	0,003
15	0327HLDN_8_15	QC 2 B1	QC	5	5,57	11,32	1,22	11026	26173	42069	1,22	0,884
16	0327HLDN_8_16	QC 3 B1	QC	25	24,92	-0,32	1,22	56826	137543	47487	1,22	4,093
17	0327HLDN_8_17	QC 2 B2	QC	5	5,27	5,46	1,22	12521	30146	50851	1,22	0,839
18	0327HLDN_8_18	QC 3 B2	QC	25	24,16	-3,36	1,22	57925	139961	49987	1,22	3,959
19	0327HLDN_8_19	QC 2 B3	QC	5	5,23	4,66	1,22	11088	27649	46506	1,22	0,833
20	0327HLDN_8_20	QC 3 B3	QC	25	23,57	-5,73	1,22	59723	144972	53107	1,22	3,854
21	0327HLDN_8_21	QC 2 B4	QC	5	5,48	9,51	1,22	8465	20389	33154	1,22	0,87
22	0327HLDN_8_22	QC 3 B4	QC	25	24,35	-2,59	1,22	52529	127817	45169	1,22	3,993
23	0327HLDN_8_23	QC 2 B5	QC	5	5,2	4,08	1,22	11554	27987	47729	1,22	0,828
24	0327HLDN_8_24	QC 3 B5	QC	25	24	-3,99	1,22	57196	140481	50288	1,22	3,931
25	0327HLDN_8_25	QC 2 B6	QC	5	5,19	3,79	1,22	11260	27492	46903	1,22	0,826
26	0327HLDN_8_26	QC 3 B6	QC	25	25,23	0,93	1,22	50268	122699	41693	1,22	4,149
27	0327HLDN_8_27	qcDLN_B_PRO	QC	5	4,83	-3,44	1,22	7271	17378	31986	1,22	0,771

Compound 3: ZyklopentiksoL_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	Area	IS Area	IS RT	Response
1	0327HLDN_8_01	Std0	Blank									
2	0327HLDN_8_02	Std0	Blank							49314	1,21	
3	0327HLDN_8_03	Std0	Blank							99573	1,2	
4	0327HLDN_8_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	5164	3898	87727	1,2	0,059
5	0327HLDN_8_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	33374	26051	64665	1,19	0,516
6	0327HLDN_8_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	136002	108542	63158	1,19	2,153
7	0327HLDN_8_07	Std0	Blank							75755	1,19	
8	0327HLDN_8_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	24,37	-2,51	1,2	21086	16657	83090	1,19	0,254
9	0327HLDN_8_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	154,1	2,76	1,2	166883	133196	102115	1,19	1,634
10	0327HLDN_8_10	ST 0 B	Blank							180412	1,19	
11	0327HLDN_8_11	ST 2 B	QC	5	4,57	-8,67	1,2	8642	7209	158466	1,19	0,055
12	0327HLDN_8_12	ST 3 B	QC	50	49,73	-0,54	1,2	91421	74025	178106	1,19	0,513
13	0327HLDN_8_13	ST 4 B	QC	200	205,3	2,64	1,2	568470	449926	256751	1,19	2,214
14	0327HLDN_8_14	ST 0 B	Blank							182961	1,19	
15	0327HLDN_8_15	QC 2 B1	QC	25	26,42	5,68	1,2	69314	56495	252451	1,19	0,275
16	0327HLDN_8_16	QC 3 B1	QC	150	157,4	4,92	1,2	446208	354001	267117	1,19	1,67
17	0327HLDN_8_17	QC 2 B2	QC	25	25,81	3,24	1,2	75892	60827	282783	1,19	0,268
18	0327HLDN_8_18	QC 3 B2	QC	150	150,8	0,53	1,2	447556	362489	280223	1,19	1,597
19	0327HLDN_8_19	QC 2 B3	QC	25	25,01	0,04	1,2	68777	55677	264284	1,19	0,26
20	0327HLDN_8_20	QC 3 B3	QC	150	152,2	1,48	1,2	463850	377975	287571	1,19	1,613
21	0327HLDN_8_21	QC 2 B4	QC	25	25,17	0,69	1,2	54483	44619	208034	1,19	0,262
22	0327HLDN_8_22	QC 3 B4	QC	150	152,1	1,42	1,2	407221	324539	252621	1,19	1,612
23	0327HLDN_8_23	QC 2 B5	QC	25	25,81	3,25	1,2	73482	60101	273802	1,19	0,268
24	0327HLDN_8_24	QC 3 B5	QC	150	152,4	1,58	1,2	454962	367968	281779	1,19	1,615
25	0327HLDN_8_25	QC 2 B6	QC	25	25,49	1,96	1,2	71943	58143	271353	1,19	0,265
26	0327HLDN_8_26	QC 3 B6	QC	150	153,8	2,53	1,2	390994	317720	239812	1,19	1,63
27	0327HLDN_8_27	qcDLN_B_PRO	QC	25	24,14	-3,46	1,2	44469	37306	176901	1,19	0,251

Vedlegg 10: Rådatamaterialet for forsøk 0329HLDN_9

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_02	Std0	Blank							20429	1,15	
3	0329HLDN_9_03	Std0	Blank							24238	1,16	
4	0329HLDN_9_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	4172	2707	19427	1,16	0,215
5	0329HLDN_9_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	20760	13288	23301	1,15	0,891
6	0329HLDN_9_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	190250	121627	37361	1,15	5,092
7	0329HLDN_9_07	Std0	Blank				1,17	94	67	28114	1,15	0,003
8	0329HLDN_9_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,88	-2,32	1,16	23732	15261	27235	1,15	0,871
9	0329HLDN_9_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,32	-2,71	1,16	143178	90685	34569	1,15	4,142
10	0329HLDN_9_10	STOB	Blank				1,16	119	47	60406	1,15	0,002
11	0329HLDN_9_11	ST2B	QC	1	1,22	21,88	1,15	14778	9520	58697	1,15	0,252
12	0329HLDN_9_12	ST3B	QC	5	5,22	4,36	1,15	60173	38401	64859	1,15	0,928
13	0329HLDN_9_13	ST4B	QC	30	30,38	1,28	1,15	299323	193972	58052	1,15	5,156
14	0329HLDN_9_14	STOB	QC				1,16	48	20	60430	1,15	0,001
15	0329HLDN_9_15	QC2B	QC	5	5,27	5,38	1,15	65293	42241	69729	1,15	0,936
16	0329HLDN_9_16	QC3B	QC	25	25,74	2,95	1,15	326269	212409	74508	1,15	4,379
17	0329HLDN_9_17	Std0	Blank				1,16	70	60	31472	1,15	0,002
18	0329HLDN_9_18	ST1S	QC	0,1			1,15	555	314	24164	1,15	0,023
19	0329HLDN_9_19	STOB	Blank				1,23	24	71	59118	1,15	0
20	0329HLDN_9_20	ST1B	QC	0,1			1,15	1645	1034	64623	1,15	0,025
21	0329HLDN_9_21	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,03	0,5	1,15	25252	16116	28205	1,15	0,895

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_02	Std0	Blank				1,23	11	25	10073	1,22	0,004
3	0329HLDN_9_03	Std0	Blank				1,27	14	27	12935	1,22	0,003
4	0329HLDN_9_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	561	1225	10104	1,22	0,177
5	0329HLDN_9_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	3044	7234	11933	1,22	0,861
6	0329HLDN_9_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	31476	74072	19347	1,22	5,455
7	0329HLDN_9_07	Std0	Blank				1,26	18	33	14950	1,22	0,003
8	0329HLDN_9_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,07	1,43	1,22	3794	9318	15007	1,22	0,874
9	0329HLDN_9_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,4	-2,39	1,22	22613	54392	17583	1,22	4,38
10	0329HLDN_9_10	STOB	Blank				1,22	15	36	45435	1,22	0,001
11	0329HLDN_9_11	ST2B	QC	1	0,91	-8,9	1,22	2260	5172	45972	1,22	0,162
12	0329HLDN_9_12	ST3B	QC	5	4,76	-4,73	1,22	10994	25493	44471	1,22	0,82
13	0329HLDN_9_13	ST4B	QC	30	26,27	-12,42	1,22	56435	134618	40338	1,22	4,736
14	0329HLDN_9_14	STOB	Blank				1,23	9	16	47753	1,22	0,001
15	0329HLDN_9_15	QC2B	QC	5	4,78	-4,4	1,22	12007	29518	50434	1,22	0,823
16	0329HLDN_9_16	QC3B	QC	25	22,5	-9,98	1,22	61788	147047	51936	1,22	4,021
17	0329HLDN_9_17	Std0	Blank				1,2	6	7	18968	1,22	0,001
18	0329HLDN_9_18	ST1S	QC	0,1	0,07	-30,72	1,22	83	193	14159	1,22	0,019
19	0329HLDN_9_19	STOB	Blank				1,19	4	7	47115	1,22	0
20	0329HLDN_9_20	ST1B	QC	0,1	0,05	-45,18	1,22	297	560	50393	1,22	0,017
21	0329HLDN_9_21	qcDLN_B_PRO	QC	5	4,66	-6,72	1,22	3996	10154	17615	1,22	0,803

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	17 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_02	Std0	Blank							54651	1,19	
3	0329HLDN_9_03	Std0	Blank							74368	1,2	
4	0329HLDN_9_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	3586	2774	62447	1,2	0,057
5	0329HLDN_9_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	40411	32061	73576	1,19	0,549
6	0329HLDN_9_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	261270	204237	109681	1,19	2,382
7	0329HLDN_9_07	Std0	Blank							91317	1,19	
8	0329HLDN_9_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	25,8	3,18	1,2	24579	19493	87353	1,19	0,281
9	0329HLDN_9_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	153,34	2,23	1,2	178638	141920	100356	1,19	1,78
10	0329HLDN_9_10	STOB	Blank							235965	1,19	
11	0329HLDN_9_11	ST2B	QC	5	5,12	2,44	1,2	13594	10539	231525	1,19	0,059
12	0329HLDN_9_12	ST3B	QC	50	51,5	3	1,2	132390	103217	233867	1,19	0,566
13	0329HLDN_9_13	ST4B	QC	200	193,94	-3,03	1,2	463026	361279	201119	1,19	2,302
14	0329HLDN_9_14	STOB	Blank							242452	1,19	
15	0329HLDN_9_15	QC2B	QC	25	25,56	2,26	1,2	74906	60379	268630	1,19	0,279
16	0329HLDN_9_16	QC3B	QC	150	150,39	0,26	1,2	461000	362262	264494	1,19	1,743
17	0329HLDN_9_17	Std0	Blank							110105	1,19	
18	0329HLDN_9_18	ST1S	QC	1	0,67	-32,64	1,19	955	932	82749	1,19	0,012
19	0329HLDN_9_19	STOB	Blank							238755	1,19	
20	0329HLDN_9_20	ST1B	QC	1	0,15	-84,56	1,19	1522	1350	251352	1,19	0,006
21	0329HLDN_9_21	qcDLN_B_PRO	QC	25	24,33	-2,69	1,2	26077	21238	98269	1,19	0,265

Vedlegg 11: Rådatamaterialet for forsøk 0329HLDN_9_b

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ¹ Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_b_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_b_02	Std0	Blank				1,24	6	25	18484	1,17	0
3	0329HLDN_9_b_03	Std0	Blank				1,16	13	52	18102	1,16	0,001
4	0329HLDN_9_b_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	4752	3406	19458	1,16	0,244
5	0329HLDN_9_b_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	21298	14659	22816	1,16	0,933
6	0329HLDN_9_b_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	161917	110142	30589	1,15	5,293
7	0329HLDN_9_b_07	Std0	Blank				1,18	59	58	17663	1,15	0,003
8	0329HLDN_9_b_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,03	0,51	1,16	23622	16171	25186	1,15	0,938
9	0329HLDN_9_b_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	25,97	3,88	1,16	144046	96968	31422	1,15	4,584
10	0329HLDN_9_b_10	STOB	Blank				1,16	57	66	49041	1,15	0,001
11	0329HLDN_9_b_11	ST2B	QC	1	1,12	11,98	1,16	12818	8720	48401	1,15	0,265
12	0329HLDN_9_b_12	ST3B	QC	5	5,33	6,66	1,16	54324	37782	54821	1,15	0,991
13	0329HLDN_9_b_13	ST4B	QC	30	31,05	3,50	1,16	218686	149713	39919	1,15	5,478
14	0329HLDN_9_b_14	STOB	Blank				1,17	57	6	47822	1,15	0,001
15	0329HLDN_9_b_15	QC2B	QC	5	5,42	8,38	1,16	54319	37554	54007	1,15	1,006
16	0329HLDN_9_b_16	QC3B	QC	25	26,73	6,92	1,16	295229	202689	62577	1,15	4,718
17	0329HLDN_9_b_17	Std0	Blank							15634	1,15	
18	0329HLDN_9_b_18	ST1S	QC	0,1			1,16	624	416	22717	1,15	0,027
19	0329HLDN_9_b_19	STOB	Blank				1,16	29	36	47753	1,15	0,001
20	0329HLDN_9_b_20	ST1B	QC	0,1			1,16	1518	898	52945	1,15	0,029
21	0329HLDN_9_b_21	qcDLDN_B_PRO	QC	5	4,98	-0,39	1,16	22187	15467	23855	1,15	0,93

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ¹ Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_b_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_b_02	Std0	Blank							12693	1,23	
3	0329HLDN_9_b_03	Std0	Blank				1,2	7	32	12752	1,23	0,003
4	0329HLDN_9_b_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	604	1191	11545	1,22	0,156
5	0329HLDN_9_b_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	3125	7499	14614	1,22	0,727
6	0329HLDN_9_b_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	26469	66862	19883	1,22	4,694
7	0329HLDN_9_b_07	Std0	Blank				1,23	13	52	13201	1,22	0,005
8	0329HLDN_9_b_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,76	15,18	1,22	4328	10401	17590	1,22	0,837
9	0329HLDN_9_b_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	26,55	6,19	1,22	24644	62206	21153	1,22	4,106
10	0329HLDN_9_b_10	STOB	Blank				1,23	13	29	44987	1,22	0,001
11	0329HLDN_9_b_11	ST2B	QC	1	1	-0,14	1,22	2123	5026	46026	1,22	0,155
12	0329HLDN_9_b_12	ST3B	QC	5	5,18	3,58	1,22	10096	25210	46888	1,22	0,753
13	0329HLDN_9_b_13	ST4B	QC	30	29,86	-0,47	1,22	37975	94574	28386	1,22	4,67
14	0329HLDN_9_b_14	STOB	Blank				1,21	26	20	45239	1,22	0,001
15	0329HLDN_9_b_15	QC2B	QC	5	5,57	11,41	1,22	10098	25804	44329	1,22	0,81
16	0329HLDN_9_b_16	QC3B	QC	25	25,78	3,13	1,22	55941	143094	50046	1,22	3,977
17	0329HLDN_9_b_17	Std0	Blank							10978	1,22	
18	0329HLDN_9_b_18	ST1S	QC	0,1	0,01	-90,17	1,22	81	174	15217	1,22	0,017
19	0329HLDN_9_b_19	STOB	Blank				1,24	18	32	46097	1,22	0,001
20	0329HLDN_9_b_20	ST1B	QC	0,1	0,01	-89,10	1,22	239	581	48451	1,22	0,017
21	0329HLDN_9_b_21	qcDLDN_B_PRO	QC	5	5,78	15,51	1,22	4025	10420	17201	1,22	0,84

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0329HLDN_9_b_01	Std0	Blank									
2	0329HLDN_9_b_02	Std0	Blank							70087	1,21	
3	0329HLDN_9_b_03	Std0	Blank							70711	1,2	
4	0329HLDN_9_b_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	4281	3725	65970	1,2	0,065
5	0329HLDN_9_b_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	45910	40928	78010	1,2	0,589
6	0329HLDN_9_b_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	248341	224611	98743	1,19	2,515
7	0329HLDN_9_b_07	Std0	Blank							69088	1,19	
8	0329HLDN_9_b_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	25,38	1,52	1,2	27080	24202	90586	1,19	0,299
9	0329HLDN_9_b_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	155,96	3,97	1,2	204834	179789	106659	1,19	1,92
10	0329HLDN_9_b_10	STOB	Blank							203078	1,19	
11	0329HLDN_9_b_11	ST2B	QC	5	4,99	-0,14	1,2	13033	11410	201080	1,19	0,065
12	0329HLDN_9_b_12	ST3B	QC	50	52,89	5,78	1,2	129527	114688	207916	1,2	0,623
13	0329HLDN_9_b_13	ST4B	QC	200	197,42	-1,29	1,2	350272	317271	141267	1,19	2,48
14	0329HLDN_9_b_14	STOB	Blank							199070	1,19	
15	0329HLDN_9_b_15	QC2B	QC	25	26,41	5,65	1,2	66067	59681	212483	1,19	0,311
16	0329HLDN_9_b_16	QC3B	QC	150	158,22	5,48	1,2	441885	395750	226562	1,19	1,95
17	0329HLDN_9_b_17	Std0	Blank							60799	1,19	
18	0329HLDN_9_b_18	ST1S	QC	1	0,48	-51,68	1,2	1085	1059	79024	1,19	0,014
19	0329HLDN_9_b_19	STOB	Blank							196770	1,19	
20	0329HLDN_9_b_20	ST1B	QC	1			1,2	1597	1487	207484	1,19	0,008
21	0329HLDN_9_b_21	qcDLDN_B_PRO	QC	25	25,32	1,28	1,2	25430	22578	85270	1,19	0,298

Vedlegg 12: Rådatamaterialet for forsøk 0402HLDN_10

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ² Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10_02	Std0	Blank				1,14	9	20	28475	1,15	0
3	0402HLDN_10_03	Std0	Blank				1,2	4	52	29741	1,16	0
4	0402HLDN_10_04	Std2	Standard	1	1	0	1,17	7183	4637	28955	1,16	0,248
5	0402HLDN_10_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	25911	17210	28732	1,16	0,902
6	0402HLDN_10_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	96874	64448	18786	1,16	5,157
7	0402HLDN_10_07	Std0	Blank				1,16	34	5	28580	1,16	0,001
8	0402HLDN_10_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,14	2,85	1,16	20385	13389	22032	1,15	0,925
9	0402HLDN_10_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,31	-2,77	1,16	129710	86647	31162	1,15	4,162
10	0402HLDN_10_10	ST0 B	Blank				1,17	22	34	53822	1,15	0
11	0402HLDN_10_11	ST2 B	QC	1	1,05	4,54	1,16	13214	9619	51727	1,15	0,255
12	0402HLDN_10_12	ST3 B	QC	5	5,49	9,88	1,16	45675	31304	46459	1,15	0,983
13	0402HLDN_10_13	ST4 B	QC	30	31,77	5,9	1,16	317839	216437	58115	1,15	5,469
14	0402HLDN_10_14	ST0 B	Blank				1,16	80	53	53334	1,15	0,001
15	0402HLDN_10_15	QC2 B	QC	5	5,36	7,28	1,16	63649	43035	66184	1,15	0,962
16	0402HLDN_10_16	QC3 B	QC	25	26,63	6,52	1,16	264040	180242	57825	1,15	4,566
17	0402HLDN_10_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,08	1,51	1,16	19710	12966	21558	1,15	0,914

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 ² Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10_02	Std0	Blank				1,21	22	34	22994	1,22	0,002
3	0402HLDN_10_03	Std0	Blank				1,15	18	92	25325	1,23	0,004
4	0402HLDN_10_04	Std2	Standard	1	1	0	1,23	1127	2332	22948	1,23	0,151
5	0402HLDN_10_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	4751	11427	23005	1,22	0,703
6	0402HLDN_10_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	18053	43248	13844	1,22	4,428
7	0402HLDN_10_07	Std0	Blank				1,24	10	63	24976	1,22	0,003
8	0402HLDN_10_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,43	8,57	1,22	3854	9769	17850	1,22	0,763
9	0402HLDN_10_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	25,08	0,33	1,22	24424	61788	23565	1,22	3,658
10	0402HLDN_10_10	ST0 B	Blank				1,25	14	9	56386	1,22	0
11	0402HLDN_10_11	ST2 B	QC	1	1,01	0,88	1,22	2125	5703	51511	1,22	0,152
12	0402HLDN_10_12	ST3 B	QC	5	5,15	2,97	1,22	10112	25145	48699	1,22	0,724
13	0402HLDN_10_13	ST4 B	QC	30	30,71	2,38	1,22	64154	160531	49477	1,22	4,541
14	0402HLDN_10_14	ST0 B	Blank							57281	1,22	
15	0402HLDN_10_15	QC2 B	QC	5	5,22	4,45	1,22	13570	34228	65089	1,22	0,734
16	0402HLDN_10_16	QC3 B	QC	25	25,63	2,54	1,22	51965	130406	48713	1,22	3,744
17	0402HLDN_10_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,46	9,14	1,22	3747	9181	16852	1,22	0,767

Compound 3: Zyklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	IS Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10_02	Std0	Blank							100462	1,2	
3	0402HLDN_10_03	Std0	Blank							106305	1,2	
4	0402HLDN_10_04	Std2	Standard	5	5	0	1,21	7120	5912	109015	1,2	0,065
5	0402HLDN_10_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	59655	51735	98337	1,2	0,607
6	0402HLDN_10_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	147200	132100	59175	1,2	2,488
7	0402HLDN_10_07	Std0	Blank							100901	1,19	
8	0402HLDN_10_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	25,64	2,57	1,2	23041	20415	73774	1,19	0,312
9	0402HLDN_10_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	151,52	1,01	1,2	183646	163078	98377	1,19	1,867
10	0402HLDN_10_10	ST0 B	Blank							214771	1,19	
11	0402HLDN_10_11	ST2 B	QC	5	5,05	1,02	1,2	13183	11811	199976	1,19	0,066
12	0402HLDN_10_12	ST3 B	QC	50	53,56	7,11	1,2	117800	102504	181265	1,19	0,65
13	0402HLDN_10_13	ST4 B	QC	200	213,27	6,63	1,2	525860	455715	197724	1,19	2,66
14	0402HLDN_10_14	ST0 B	Blank							214041	1,2	
15	0402HLDN_10_15	QC2 B	QC	25	26,74	6,94	1,2	82086	71717	252218	1,19	0,325
16	0402HLDN_10_16	QC3 B	QC	150	160,35	6,9	1,2	391819	342215	198000	1,19	1,979
17	0402HLDN_10_17	qcDLN_B_PRO	QC	25	25,85	3,41	1,2	22417	19924	71197	1,19	0,315

Vedlegg 13: Rådatamaterialet for forsøk 0402HLDN_10dag1

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 \square Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10dag1_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10dag1_02	Std0	Blank				1,13	15	9	33237	1,12	0
3	0402HLDN_10dag1_03	Std0	Blank				1,14	7	25	38671	1,14	0
4	0402HLDN_10dag1_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	8424	5441	36158	1,15	0,233
5	0402HLDN_10dag1_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	38151	25085	42867	1,15	0,89
6	0402HLDN_10dag1_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	207655	134993	42625	1,15	4,872
7	0402HLDN_10dag1_07	Std0	Blank				1,16	64	60	39031	1,15	0,002
8	0402HLDN_10dag1_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,98	-0,3	1,15	31840	20378	35876	1,15	0,888
9	0402HLDN_10dag1_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,35	-2,59	1,15	180432	119189	45210	1,15	3,991
10	0402HLDN_10dag1_10	ST0 B	Blank				1,16	67	38	66146	1,15	0,001
11	0402HLDN_10dag1_11	ST2 B	QC	1	1,07	6,89	1,15	15740	10456	64418	1,15	0,244
12	0402HLDN_10dag1_12	ST3 B	QC	5	5,32	6,32	1,15	55694	36813	59147	1,15	0,942
13	0402HLDN_10dag1_13	ST4 B	QC	30	32,9	9,66	1,15	403764	266773	75908	1,15	5,319
14	0402HLDN_10dag1_14	ST0 B	Blank				1,16	113	82	66404	1,15	0,002
15	0402HLDN_10dag1_15	QC2 B	QC	5	5,16	3,13	1,15	80620	52884	88051	1,15	0,916
16	0402HLDN_10dag1_16	QC3 B	QC	25	26,94	7,75	1,15	348071	227498	79186	1,15	4,396
17	0402HLDN_10dag1_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	4,95	-0,98	1,15	31269	20339	35453	1,15	0,882

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1 \square Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10dag1_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10dag1_02	Std0	Blank							21053	1,2	
3	0402HLDN_10dag1_03	Std0	Blank							24508	1,22	
4	0402HLDN_10dag1_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	965	2434	21843	1,22	0,156
5	0402HLDN_10dag1_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	6041	13995	26124	1,22	0,767
6	0402HLDN_10dag1_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	31989	76026	24224	1,22	4,459
7	0402HLDN_10dag1_07	Std0	Blank							26667	1,22	
8	0402HLDN_10dag1_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	5,52	10,46	1,22	5416	12646	21338	1,22	0,846
9	0402HLDN_10dag1_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	27,52	10,06	1,22	31543	72847	25449	1,22	4,102
10	0402HLDN_10dag1_10	ST0 B	Blank							53957	1,22	
11	0402HLDN_10dag1_11	ST2 B	QC	1	1	0,34	1,22	2331	5329	49070	1,22	0,156
12	0402HLDN_10dag1_12	ST3 B	QC	5	4,88	-2,41	1,22	10519	25314	47863	1,22	0,749
13	0402HLDN_10dag1_13	ST4 B	QC	30	31,99	6,62	1,22	74691	175931	52845	1,22	4,743
14	0402HLDN_10dag1_14	ST0 B	Blank							55892	1,22	
15	0402HLDN_10dag1_15	QC2 B	QC	5	5	0,04	1,22	15994	38618	71176	1,22	0,767
16	0402HLDN_10dag1_16	QC3 B	QC	25	27,08	8,31	1,22	60118	146649	51193	1,22	4,039
17	0402HLDN_10dag1_17	qcDLN_B_PRO	QC	5	5,48	9,55	1,22	5548	12795	21850	1,22	0,84

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	17 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0402HLDN_10dag1_01	Std0	Blank									
2	0402HLDN_10dag1_02	Std0	Blank							96248	1,17	
3	0402HLDN_10dag1_03	Std0	Blank							116638	1,19	
4	0402HLDN_10dag1_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	6996	5865	112282	1,19	0,062
5	0402HLDN_10dag1_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	74628	61257	128043	1,19	0,583
6	0402HLDN_10dag1_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	276443	231226	115769	1,19	2,388
7	0402HLDN_10dag1_07	Std0	Blank							124353	1,19	
8	0402HLDN_10dag1_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	25,44	1,77	1,2	31606	25461	106218	1,19	0,298
9	0402HLDN_10dag1_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	150,78	0,52	1,2	228786	188843	128262	1,19	1,784
10	0402HLDN_10dag1_10	ST0 B	Blank							236268	1,19	
11	0402HLDN_10dag1_11	ST2 B	QC	5	5	0,09	1,2	13801	11643	221319	1,19	0,062
12	0402HLDN_10dag1_12	ST3 B	QC	50	52,39	4,79	1,2	126713	106705	207457	1,19	0,611
13	0402HLDN_10dag1_13	ST4 B	QC	200	211,86	5,93	1,2	604182	501116	238312	1,19	2,535
14	0402HLDN_10dag1_14	ST0 B	Blank							240315	1,19	
15	0402HLDN_10dag1_15	QC2 B	QC	25	25,46	1,83	1,2	91586	78203	307604	1,19	0,298
16	0402HLDN_10dag1_16	QC3 B	QC	150	160,21	6,8	1,2	458013	385319	241244	1,19	1,899
17	0402HLDN_10dag1_17	qcDLN_B_PRO	QC	25	25,04	0,16	1,2	31237	26276	106643	1,19	0,293

Vedlegg 14: Rådatamaterialet for forsøk 0411HLDN_11

Compound 1: Perfenazin_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0411HLDN_11_01	Std0	Blank									
2	0411HLDN_11_02	Std0	Blank							12144	1,13	
3	0411HLDN_11_03	Std0	Blank							13032	1,15	
4	0411HLDN_11_04	Std2	Standard	1	1	0	1,16	6912	4338	30677	1,15	0,225
5	0411HLDN_11_05	Std3	Standard	5	5	0	1,16	26825	16986	30345	1,15	0,884
6	0411HLDN_11_06	Std4	Standard	30	30	0	1,16	103506	64300	21698	1,15	4,77
7	0411HLDN_11_07	Std0	Blank				1,18	51	100	17846	1,15	0,003
8	0411HLDN_11_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,77	-4,68	1,16	19889	12345	23518	1,15	0,846
9	0411HLDN_11_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	24,77	-0,94	1,15	128917	81622	32315	1,15	3,989
10	0411HLDN_11_10	QC2REF1	QC	5	5,26	5,11	1,15	51453	31858	55583	1,15	0,926
11	0411HLDN_11_11	QC3REF1	QC	25	26,93	7,7	1,15	286006	180164	66299	1,15	4,314
12	0411HLDN_11_12	QC2REF2	QC	5	5,31	6,29	1,15	52103	32318	55703	1,15	0,935
13	0411HLDN_11_13	QC3REF2	QC	25	26,45	5,79	1,15	303923	191942	71638	1,15	4,243
14	0411HLDN_11_14	QC2REF3	QC	5	5,27	5,36	1,15	74151	45238	79921	1,15	0,928
15	0411HLDN_11_15	QC3REF3	QC	25	27,05	8,19	1,15	309481	195583	71440	1,15	4,332
16	0411HLDN_11_16	QC2TIN1	QC	5	5,24	4,82	1,15	57956	35835	62764	1,15	0,923
17	0411HLDN_11_17	QC3TIN1	QC	25	26,78	7,14	1,15	268800	170855	62616	1,15	4,293
18	0411HLDN_11_18	QC2TIN2	QC	5	5,15	3	1,15	53019	32997	58357	1,15	0,909
19	0411HLDN_11_19	QC3TIN2	QC	25	25,97	3,9	1,15	210940	132868	50568	1,15	4,171
20	0411HLDN_11_20	QC2TIN3	QC	5	5,17	3,47	1,15	58452	35791	64066	1,15	0,912
21	0411HLDN_11_21	QC3TIN3	QC	25	27,01	8,04	1,15	249615	157221	57696	1,15	4,326
22	0411HLDN_11_22	qcDLDN_B_PRO	QC	5	4,9	-2,07	1,15	23607	15041	27226	1,15	0,867

Compound 2: Flupentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	11 Area	IS Area	IS RT	Response
1	0411HLDN_11_01	Std0	Blank									
2	0411HLDN_11_02	Std0	Blank				1,21	5	11	5418	1,21	0,003
3	0411HLDN_11_03	Std0	Blank							8296	1,22	
4	0411HLDN_11_04	Std2	Standard	1	1	0	1,22	1079	2479	21605	1,22	0,165
5	0411HLDN_11_05	Std3	Standard	5	5	0	1,22	4557	10280	18449	1,22	0,804
6	0411HLDN_11_06	Std4	Standard	30	30	0	1,22	15078	36850	11242	1,22	4,619
7	0411HLDN_11_07	Std0	Blank		0,01		1,23	7	48	10173	1,22	0,005
8	0411HLDN_11_08	qc2LDN_B_PRO	QC	5	4,94	-1,22	1,22	3356	7878	14139	1,22	0,795
9	0411HLDN_11_09	qc3LDN_B_PRO	QC	25	25,36	1,44	1,22	21995	51802	18755	1,22	3,935
10	0411HLDN_11_10	QC2REF1	QC	5	4,95	-0,91	1,22	8619	20357	36356	1,22	0,797
11	0411HLDN_11_11	QC3REF1	QC	25	24,66	-1,38	1,22	49937	118937	44093	1,22	3,83
12	0411HLDN_11_12	QC2REF2	QC	5	4,82	-3,51	1,22	8925	21484	39169	1,22	0,776
13	0411HLDN_11_13	QC3REF2	QC	25	23,1	-7,6	1,22	60006	141126	55905	1,22	3,598
14	0411HLDN_11_14	QC2REF3	QC	5	4,66	-6,77	1,22	14685	35342	66665	1,22	0,75
15	0411HLDN_11_15	QC3REF3	QC	25	24,13	-3,49	1,22	54626	127941	48671	1,22	3,751
16	0411HLDN_11_16	QC2TIN1	QC	5	4,8	-4,02	1,22	10187	24125	44430	1,22	0,772
17	0411HLDN_11_17	QC3TIN1	QC	25	24,88	-0,48	1,22	45942	110390	40465	1,22	3,863
18	0411HLDN_11_18	QC2TIN2	QC	5	4,8	-3,98	1,22	9605	23262	42541	1,22	0,773
19	0411HLDN_11_19	QC3TIN2	QC	25	24,19	-3,23	1,22	32200	77130	29069	1,22	3,761
20	0411HLDN_11_20	QC2TIN3	QC	5	4,77	-4,65	1,22	10136	24973	45760	1,22	0,767
21	0411HLDN_11_21	QC3TIN3	QC	25	24,06	-3,75	1,22	43982	102400	39124	1,22	3,741
22	0411HLDN_11_22	qcDLDN_B_PRO	QC	5	4,7	-6,1	1,22	4310	10189	19183	1,22	0,756

Compound 3: Zuklopentiksol_S

	Name	ID	Type	Std. Conc	nmol/l	%Dev	RT	Area	1] Area	IS Area	IS RT	Response
1	0411HLDN_11_01	Std0	Blank									
2	0411HLDN_11_02	Std0	Blank							25259	1,17	
3	0411HLDN_11_03	Std0	Blank							44660	1,19	
4	0411HLDN_11_04	Std2	Standard	5	5	0	1,2	5781	4632	111395	1,2	0,052
5	0411HLDN_11_05	Std3	Standard	50	50	0	1,2	45798	41677	96854	1,19	0,473
6	0411HLDN_11_06	Std4	Standard	200	200	0	1,2	120644	105890	59726	1,19	2,02
7	0411HLDN_11_07	Std0	Blank							56524	1,19	
8	0411HLDN_11_08	qc2LDN_B_PRO	QC	25	24,59	-1,64	1,2	17267	15505	74202	1,19	0,233
9	0411HLDN_11_09	qc3LDN_B_PRO	QC	150	150,52	0,35	1,2	141725	125172	95428	1,19	1,485
10	0411HLDN_11_10	QC2REF1	QC	25	26,21	4,82	1,2	45727	42390	184545	1,19	0,248
11	0411HLDN_11_11	QC3REF1	QC	150	155,25	3,5	1,19	324298	280377	211238	1,19	1,535
12	0411HLDN_11_12	QC2REF2	QC	25	27,05	8,19	1,19	48456	42439	189545	1,19	0,256
13	0411HLDN_11_13	QC3REF2	QC	150	151,65	1,1	1,2	357918	317479	239067	1,19	1,497
14	0411HLDN_11_14	QC2REF3	QC	25	26,3	5,19	1,2	71307	64068	286784	1,19	0,249
15	0411HLDN_11_15	QC3REF3	QC	150	148,93	-0,71	1,19	340915	300503	232168	1,19	1,468
16	0411HLDN_11_16	QC2TIN1	QC	25	26,2	4,79	1,19	53681	48039	216717	1,19	0,248
17	0411HLDN_11_17	QC3TIN1	QC	150	153,51	2,34	1,19	302638	269293	199525	1,19	1,517
18	0411HLDN_11_18	QC2TIN2	QC	25	26,21	4,84	1,2	49577	45014	200041	1,19	0,248
19	0411HLDN_11_19	QC3TIN2	QC	150	152,41	1,6	1,19	225231	203781	149646	1,19	1,505
20	0411HLDN_11_20	QC2TIN3	QC	25	25,99	3,96	1,19	53509	47162	217714	1,19	0,246
21	0411HLDN_11_21	QC3TIN3	QC	150	153,42	2,28	1,19	275507	249545	181753	1,19	1,516
22	0411HLDN_11_22	qcDLN_B_PRO	QC	25	24,19	-3,25	1,2	20742	19406	90598	1,19	0,229

Vedlegg 15: Beregningsmateriale, Repeterbarhet

	Perfenazin		Flupentiksol		Zuklopentiksol	
	QC 2	QC 3	QC 2	QC 3	QC 2	QC 3
Parallell 1	5,58	26,43	5,57	24,92	26,42	157,38
Parallell 2	5,51	26,51	5,27	24,16	25,81	150,80
Parallell 3	5,34	26,59	5,23	23,57	25,01	152,22
Parallell 4	5,42	26,33	5,48	24,35	25,17	152,13
Parallell 5	5,47	26,59	5,2	24	25,81	152,37
Parallell 6	5,45	26,89	5,19	25,23	25,49	153,79
Middelverdi	5,46	26,56	5,32	24,37	25,62	153,12
SD-avvik	0,0813429	0,19127641	0,1612038	0,61048888	0,5106238	2,29483551
%CV	1,489342	0,72025762	3,02824931	2,5049123	1,99319681	1,49876596

Vedlegg 16: Beregningsmateriale, reproduserbarhet og riktighet

Perfenazin:

	QC 2 serum	QC 3 serum	QC 2 blod	QC 3 blod
Teoretisk verdi	5,00	25,00	5,00	25,00
0321HLDN_5	4,79	23,73	5,16	26,10
0325HLDN_6	5,00	24,60	5,56	26,87
0326HLDN_7	4,72	24,97	5,20	26,25
0327HLDN_8	4,84	24,72	5,46	26,56
0329HLDN_9	4,88	24,32	5,27	25,74
0402HLDN_10	5,14	24,31	5,36	26,63
Middelverdi	4,90	24,44	5,34	26,36
SD-avvik	0,15228263	0,42901826	0,15515733	0,40883937
%CV	3,11098329	1,75527416	2,90813963	1,55111471
%Bias	2,1	2,23333333	-6,70555555	-5,43111111

Flupentiksol:

	QC 2 serum	QC 3 serum	QC 2 blod	QC 3 blod
Teoretisk verdi	5,00	25,00	5,00	25,00
0321HLDN_5	5,32	27,45	5,56	26,75
0325HLDN_6	5,33	26,32	5,21	24,95
0326HLDN_7	5,31	24,83	5,28	25,36
0327HLDN_8	5,45	26,07	5,32	24,37
0329HLDN_9	5,07	24,40	4,78	22,50
0402HLDN_10	5,43	25,08	5,22	25,63
Middelverdi	5,32	25,69	5,23	24,93
SD-avvik	0,13541295	1,13266794	0,25396194	1,42871504
%CV	2,54615385	4,4086978	4,85741676	5,73167307
%Bias	-6,3666667	-2,7666667	-4,5666667	0,29333333

Zuklopentiksol:

	QC 2 serum	QC 3 serum	QC 2 blod	QC 3 blod
Teoretisk verdi	25,00	150,00	25,00	150,00
0321HLDN_5	25,05	151,44	26,58	155,88
0325HLDN_6	23,67	148,79	24,53	152,61
0326HLDN_7	23,84	151,93	26,01	157,71
0327HLDN_8	24,37	154,13	25,62	153,12
0329HLDN_9	25,80	153,34	25,56	150,39
0402HLDN_10	25,64	151,52	26,74	160,35
Middelverdi	24,73	151,86	25,84	155,01
SD-avvik	0,90781973	1,84743516	0,8036666	3,66712421
%CV	3,67117234	1,21655172	3,11016485	2,36573396
%Bias	1,0866667	-1,2388889	-3,3600000	-3,3400000

Vedlegg 17: Beregningsmateriale, holdbarhet tin/frys

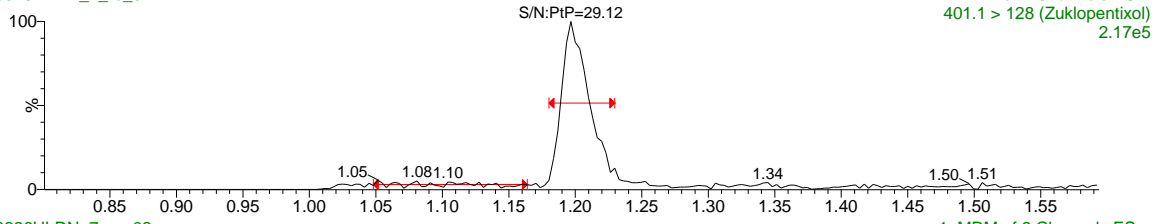
Perfenazin	0411HLDN_11		%avvik fra ref
	REF	TIN/FRYS	
QC 2 1	5,26	5,24	-0,38
QC 3 1	26,93	26,78	-0,56
QC 2 2	5,31	5,15	-3,01
QC 3 2	26,45	25,97	-1,81
QC 2 3	5,27	5,17	-1,90
QC 3 3	27,05	27,01	-0,15

Flupentiksol	0411HLDN_11		%avvik fra ref
	REF	TIN/FRYS	
QC 2 1	4,95	4,80	-3,03
QC 3 1	24,66	24,88	0,89
QC 2 2	4,82	4,80	-0,41
QC 3 2	23,10	24,19	4,72
QC 2 3	4,66	4,77	2,36
QC 3 3	24,13	24,06	-0,29

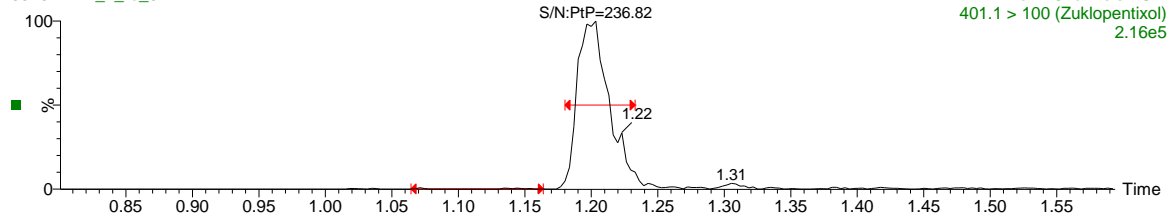
Zuklopentiksol	0411HLDN_11		%avvik fra ref
	REF	TIN/FRYS	
QC 2 1	26,21	26,20	-0,04
QC 3 1	155,25	153,51	-1,12
QC 2 2	27,05	26,21	-3,11
QC 3 2	151,65	152,41	0,50
QC 2 3	26,30	25,99	-1,18
QC 3 3	148,93	153,42	3,01

Vedlegg 18: Rådata, signal til støy i serum

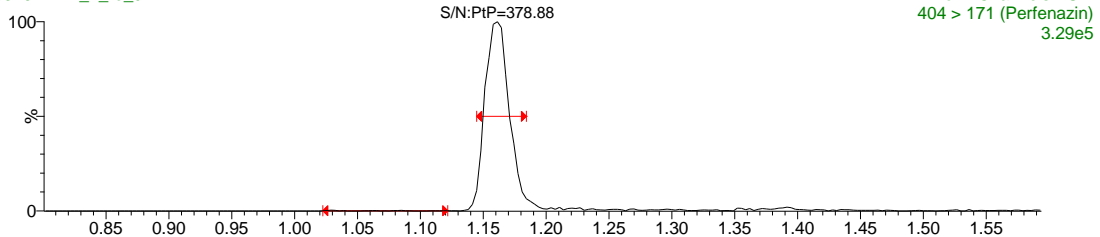
0326HLDN_7_re_02



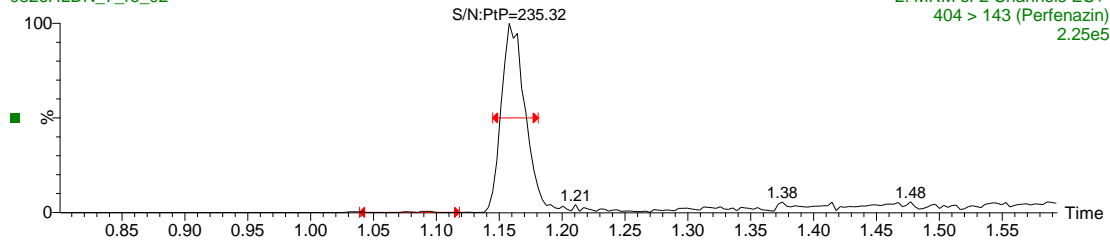
0326HLDN_7_re_02



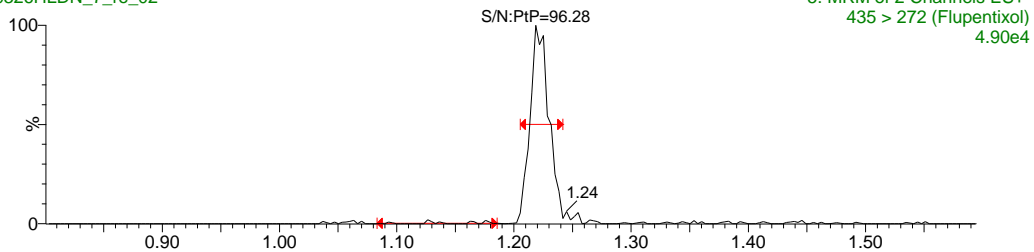
0326HLDN_7_re_02



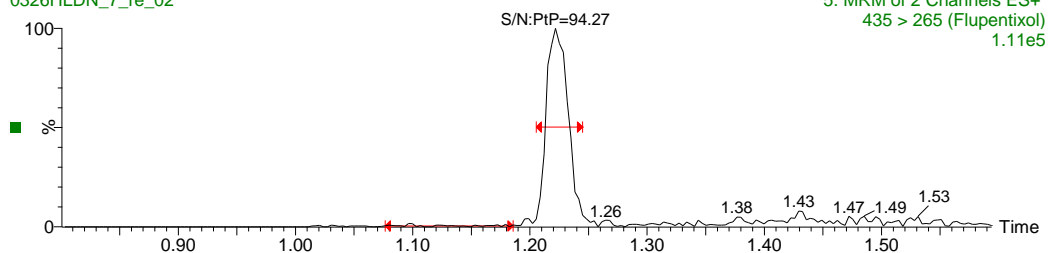
0326HLDN_7_re_02



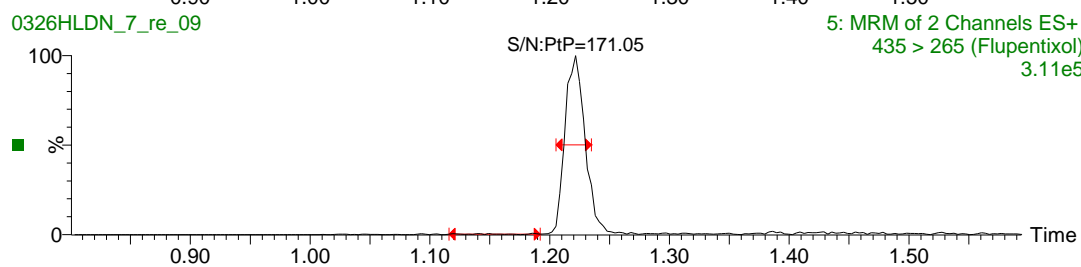
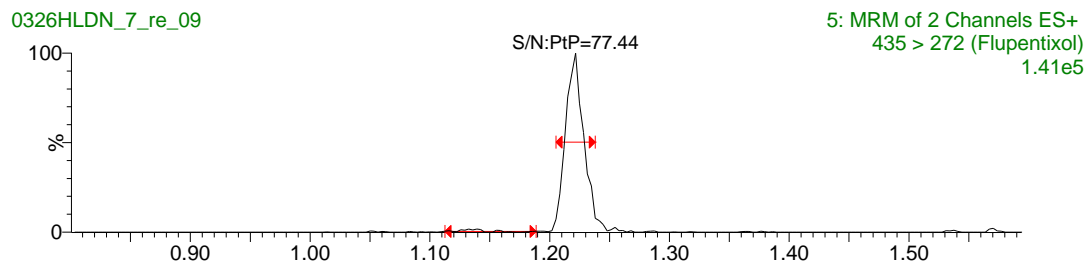
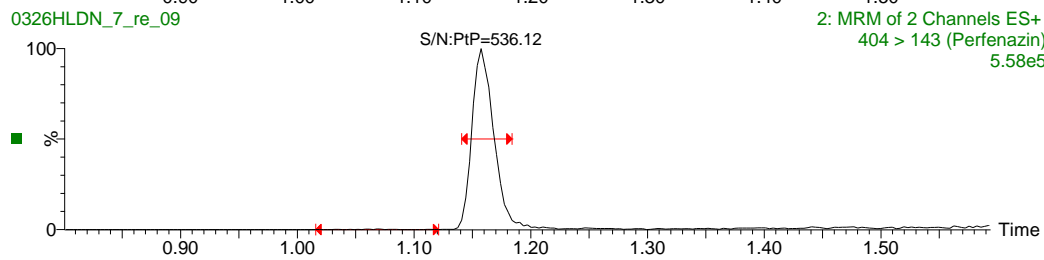
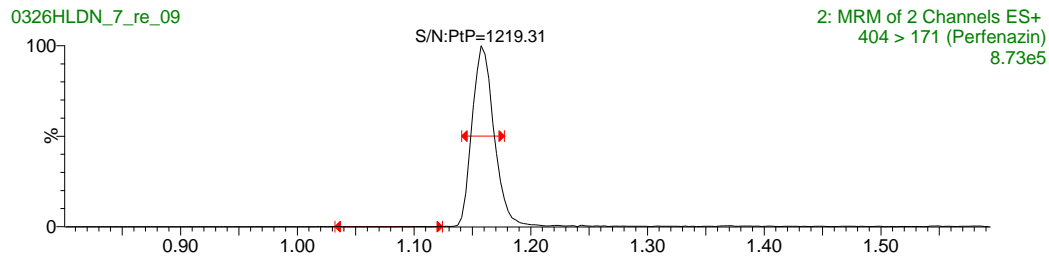
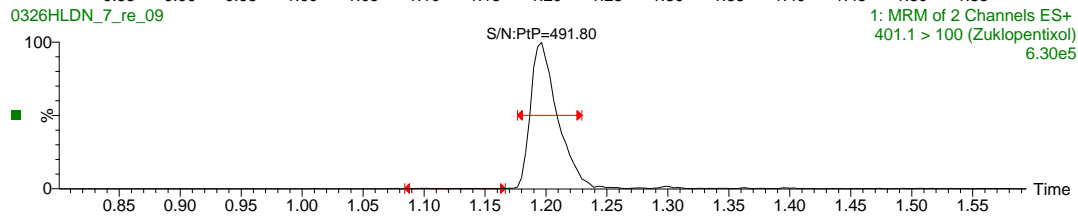
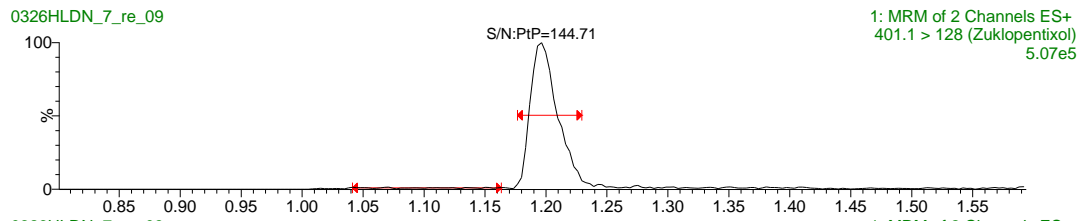
0326HLDN_7_re_02



0326HLDN_7_re_02

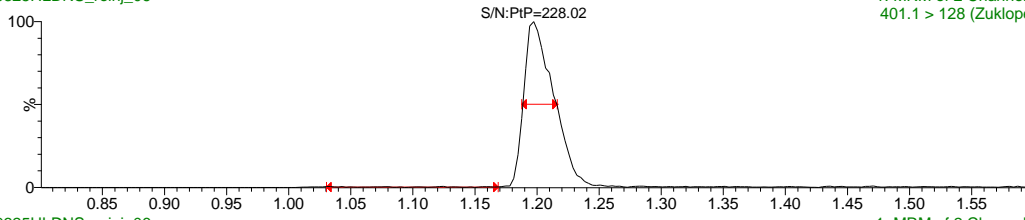


Vedlegg 19: Rådata, signal til støy i fullblod



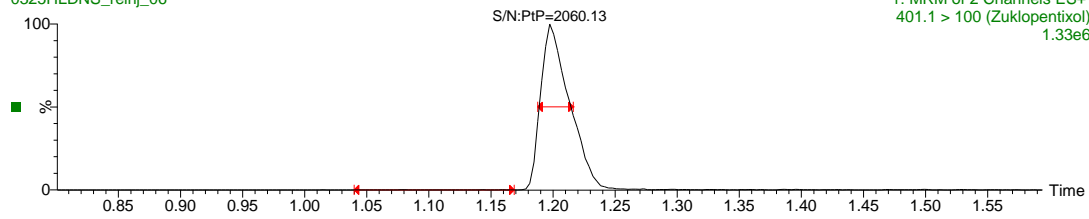
Vedlegg 20: Rådata, signal til støy i fullvalidert metode (serum)

0325HLDNS_reinj_06



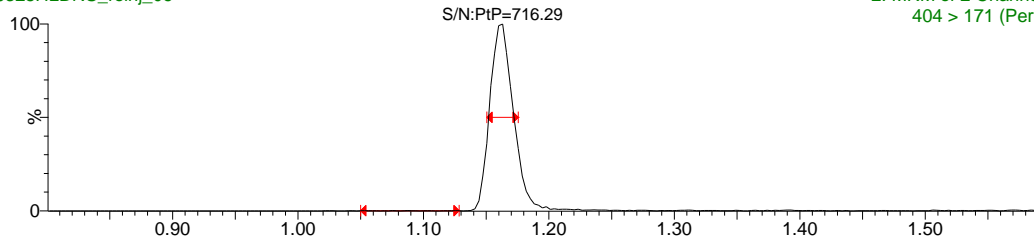
1: MRM of 2 Channels ES+
401.1 > 128 (Zukloptixol)
1.04e6

0325HLDNS_reinj_06



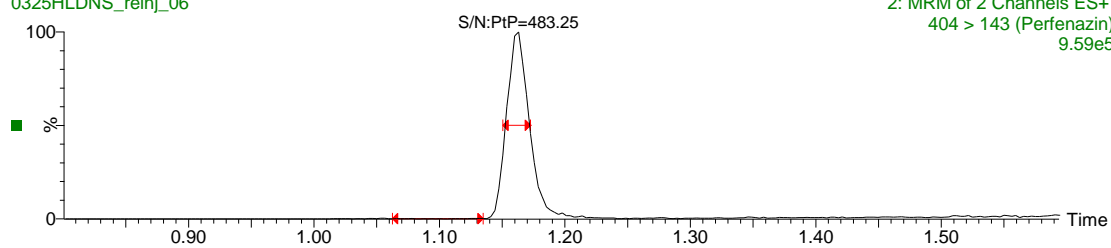
1: MRM of 2 Channels ES+
401.1 > 100 (Zukloptixol)
1.33e6

0325HLDNS_reinj_06



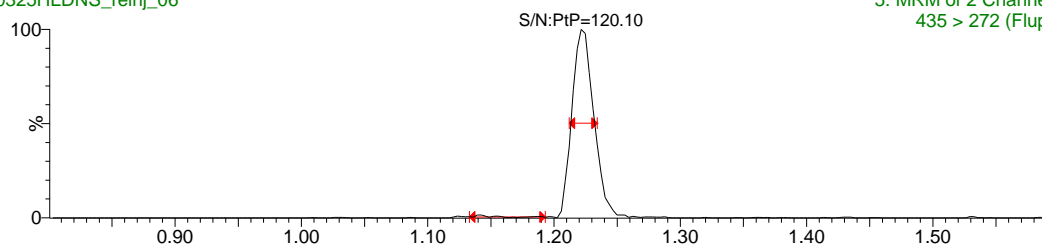
2: MRM of 2 Channels ES+
404 > 171 (Perfenazin)
1.39e6

0325HLDNS_reinj_06



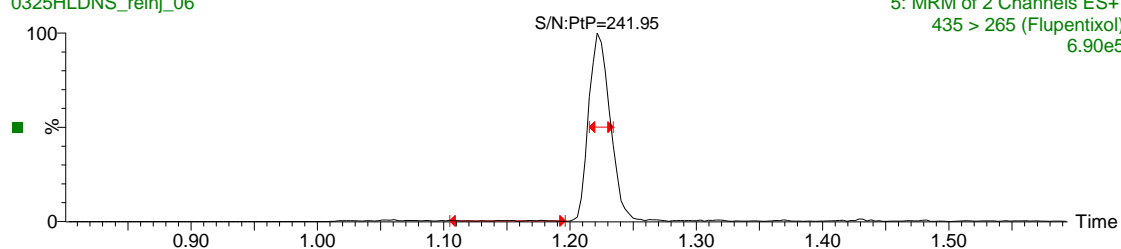
2: MRM of 2 Channels ES+
404 > 143 (Perfenazin)
9.59e5

0325HLDNS_reinj_06



5: MRM of 2 Channels ES+
435 > 272 (Flupentixol)
2.82e5

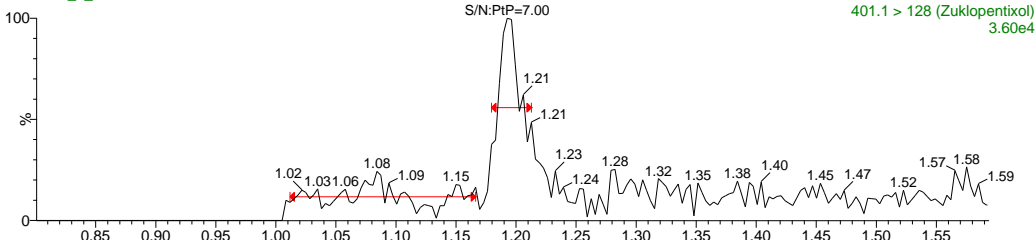
0325HLDNS_reinj_06



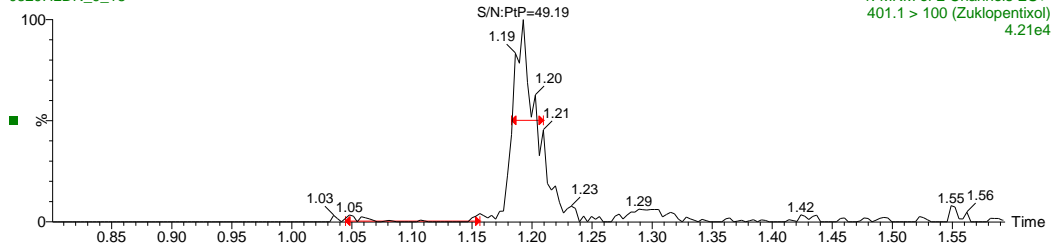
5: MRM of 2 Channels ES+
435 > 265 (Flupentixol)
6.90e5

Vedlegg 21: Rådata, signal til støy for STD 1 i serum

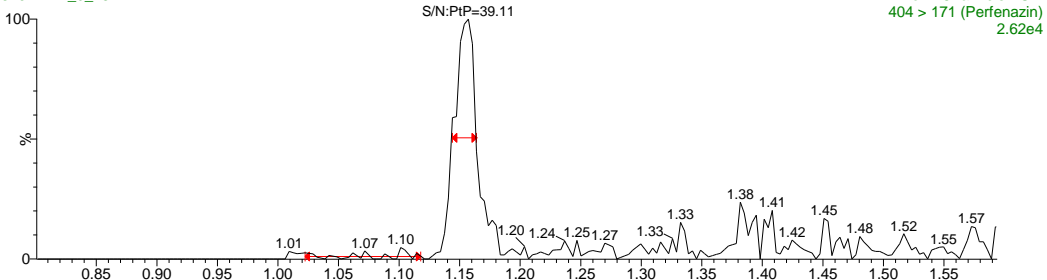
0329HLDN_9_18



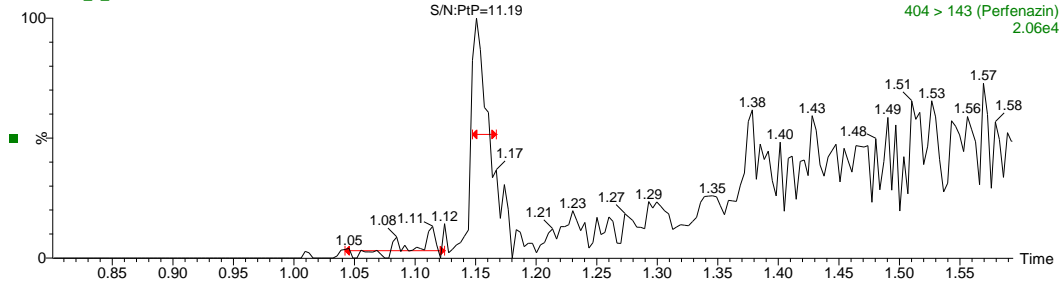
0329HLDN_9_18



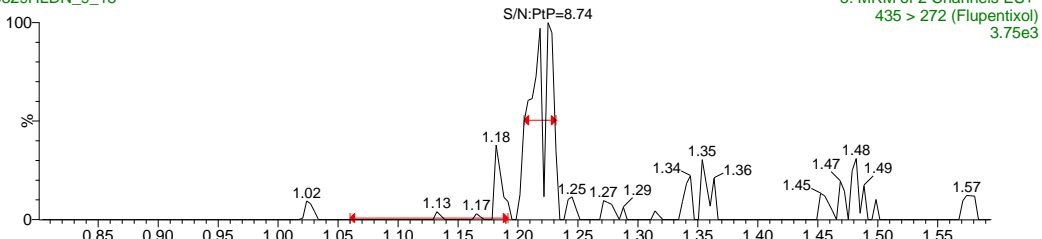
0329HLDN_9_18



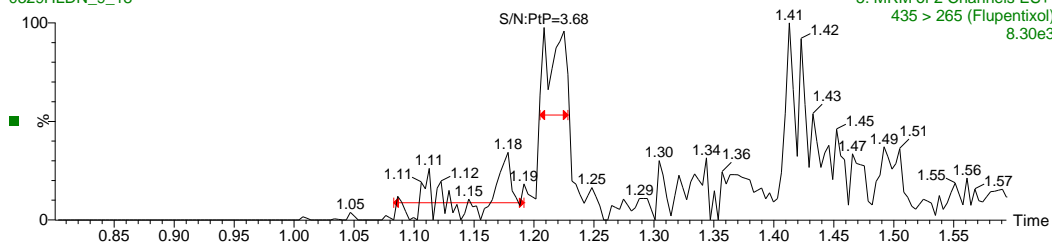
0329HLDN_9_18



0329HLDN_9_18

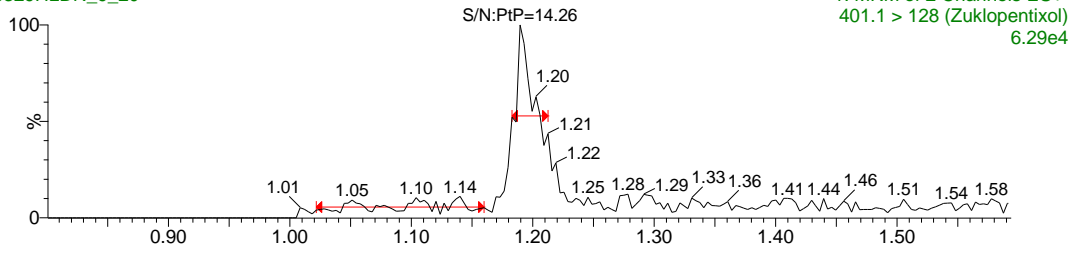


0329HLDN_9_18

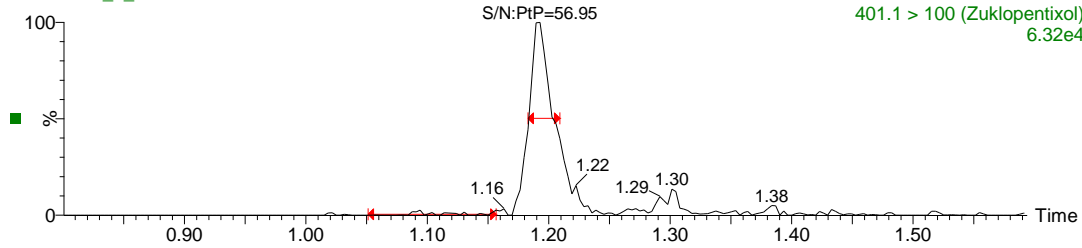


Vedlegg 22: Rådata, signal til støy for STD 1 i fullblod

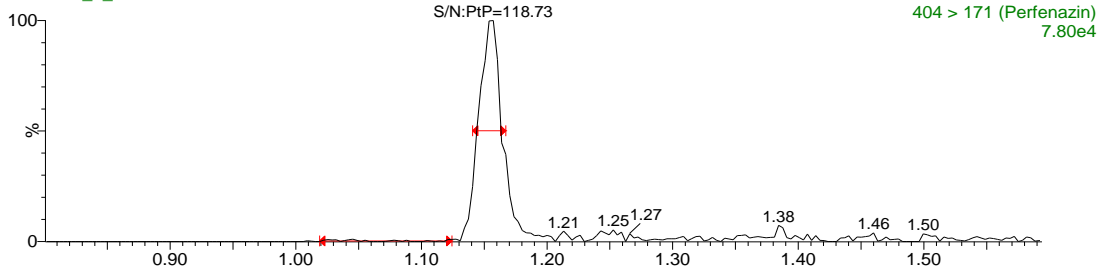
0329HLDN_9_20



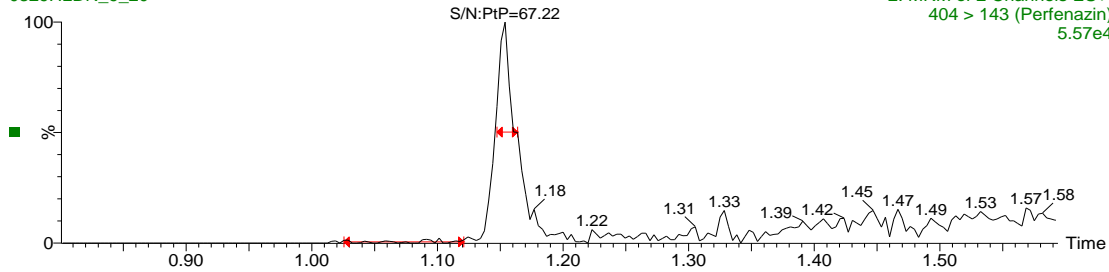
0329HLDN_9_20



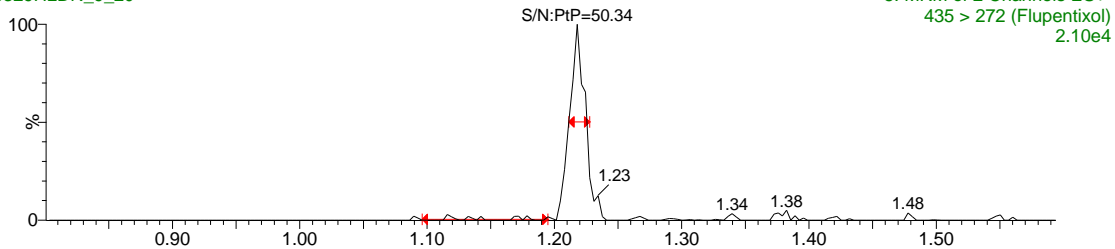
0329HLDN_9_20



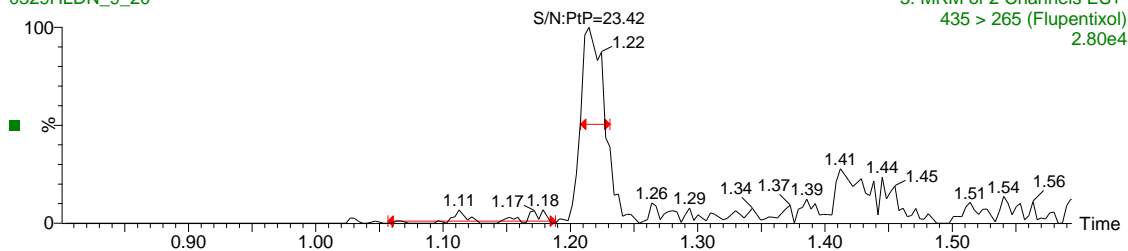
0329HLDN_9_20



0329HLDN_9_20



0329HLDN_9_20



Vedlegg 23: Datamaterialet for forklaringskoeffisienten ved serum standardkurve.

	R^2		
	Perfenazin	Flupentiksol	Zuklopentiksol
0321HLDN_5	1,00	1,00	1,00
0325HLDN_6	1,00	1,00	1,00
0326HLDN_7	1,00	1,00	1,00