



Kunnskap for en bedre verden

Validering av analysemetode for amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i humant serum med bruk av pipetteringsrobot og UHPLC-MS/MS

Miriam Hansen

Industriell kjemi og bioteknologi

Innlevert: juni 2018

Hovedveileder: Rudolf Schmid, IKJ

Medveileder: Berit Margrethe Hasle Falch, St. Olavs hospital, Avdeling for klinisk farmakologi

Solfrid Hegstad, St. Olavs hospital, Avdeling for klinisk farmakologi

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Institutt for kjemi

Forord

Masteroppgaven ble utført ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St. Olavs hospital som en del av studieprogrammet Industriell kjemi og bioteknologi ved NTNU.

Først og fremst vil jeg takke for muligheten for å skrive masteroppgave hos AKF. Jeg har lært så mye av å tilbringe det siste året her. Jeg vil spesielt takke veilederene mine Solfrid Hegstad og Berit Hasle Falch ved AKF. Takk til Solfrid for opplæring, tilbakemeldinger og muligheten til diskutere resultater med deg. Takk til Berit for god veiledning, særlig under skriveprosessen. Dere har begge alltid hatt en åpen dør for meg og mine spørsmål!

Jeg vil også takke veilederen min ved NTNU, Rudolf Schmid, for tilbakemeldinger og for hjelp til å få oversikten.

Takk til Hilde Havnen ved AKF for hjelp med robotene og til å lage og teste standarder for meg. Takk til alle ved AKF som har tatt meg så godt i mot, og som alle har vært villige til å hjelpe meg.

Miriam Hansen

Trondheim 11.06.18

Sammendrag

Sentralstimulerende midler brukes både som illegale rusmidler og til medisinsk bruk. Konsentrasjonsbestemmelse i serum utføres for å avdekke misbruk eller som kontroll i forbindelse med terapeutisk legemiddelmonitorering.

I denne oppgaven ble det utviklet og validert en ny kvantitativ analysemetode ved bruk av Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) for de fem sentralstimulerende midlene amfetamin, metamfetamin, 4-metylendioksy-metamfetamin (MDMA), 3,4-metylendioksyamfetamin (MDA) og ritalinsyre i serum. Prøveopparbeidelsen ble delvis automatisert med Hamilton Star pipetteringsrobot med proteinfelling og 96-brønns Ostro fosfolipidfjerningsplater. Prøvevolumet var 100 µl, og acetonitril med 1 % maursyre ble benyttet som fellingsreagens. Kolonnen som ble brukt var Acquity BEH C₁₈-kolonne (2,1 x 50 mm, 1,7 µm, Waters) med mobilfasegradient bestående av 5 mM ammoniumformat (pH 10,1) og acetonitril. Injeksjonsvolumet var 2 µl og analyse-tiden var 3,2 minutter. Positiv elektroprayonisering (ESI+) ble brukt i MS/MS, med to Multiple Reaction Monitoring (MRM)-overganger for hver analytt; et kvantifiseringsion og et kvalifiseringsion. ¹³C-merkede intern-standarder ble benyttet for alle analyttene bortsett fra for ritalinsyre, hvor den deutererte intern-standard ritalinsyre-d₄ ble benyttet.

Minste kvantifiserbare konsentrasjon for samtlige analytter lå mellom 25-200 nM, med deteksjonsgrenser lik 2,5-20 nM. Vektete kvadratiske kurver (1/x) innen analyttens måleområde hadde R²-verdier ≥ 0,999 for alle analyttene. Relativt standardavvik (RSD) innen en serie lå mellom 0,6-2,4 %. Mellom serier lå RSD fra 1,2 til 3,1 %, med avvik fra teoretisk verdi < 10 %. Ekstraksjonsutbytte var 77-88 %, og matrikseffekter korrigert med intern-standard var mellom 90 og 108 %. For areal av metamfetamin var overdraget etter en standard dobbelt så konsentrert som høyeste standard lik 20 % av laveste standard. Overdrag for de øvrige analyttene var < 11 %. Validering forøvrig viste tilfredsstillende resultat for variasjon i intern-standarder, ioneratio, retensjonstid, holdbarhet i opparbeidede kvalitetskontroller ved 4-10 °C og spesifisitet.

Analysemetoden skal implementeres i rutinedrift ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St. Olavs hospital. Metoden skal erstatte to eksisterende metoder og vil spare tid, arbeidskraft, løsemidler og prøvevolum.

Abstract

Central nervous system stimulants are used as both illicit and medicinal drugs. Quantification in serum is carried out to determine drug abuse or as a control in therapeutic drug monitoring.

In this thesis, a new quantitative method for analysis of the five central nervous system stimulants amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA), 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and ritalinic acid using Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed and validated. The sample preparation was partially automated using Hamilton Star pipetting robot with protein precipitation and Ostro 96-wells phospholipid removal plates. The sample volume was 100 μ L, and acetonitrile with 1 % formic acid was used as precipitation agent. The column used was Acquity BEH C₁₈ (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m, Waters) with

mobile phase gradient consisting of 5 mM ammonium formate (pH 10,1) and acetonitrile. The injection volume was 2 μ L and the run-time was 3.2 minutes. MS/MS detection was performed with positive Electrospray Ionization (ESI+) and two Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions for each analyte; a quantifier ion and a qualifier ion. ¹³C-labeled internal standards were used for all analytes except ritalinic acid, where the deuterated internal standard ritalinic acid-d₄ was used.

Limit of quantification was in the range of 25-200 nM for all analytes, with limit of detection between 2,5-20 nM. Weighted quadratic curves (1/x) in the analytes range obtained R²-values \geq 0,999 for all analytes. The between-assay relative standard deviations (RSD) were in the range of 1.2-3.1 %, with a deviation of < 10 % from the theoretical value. The within-assay RSD were in the range of 0.6-2.4 %. The recovery was 77-88 %, and matrix effects ranged from 90 to 108 %, corrected with internal standard. The carry over for the area of methamphetamine after a standard with twice the concentration of the highest standard for calibration was 20 % of the lowest standard. For all other analytes the carry over was < 11 %. Validation showed satisfying results for variation of internal standards, ion ratios, retention times, stability of extracted samples at 4-10 °C and specificity.

The method is to be implemented in routine analysis at the Department of Clinical Pharmacology at St. Olav's Hospital. The method is to replace two existing methods and will save time, manual labour, reduce use of solvent and sample volume.

Innhold

1	Introduksjon	1
1.1	Målene med oppgaven	3
2	Teori	4
2.1	Legemiddel- og rusmiddelanalyser	4
2.2	Analyttene	4
2.3	Prøveopparbeidelse	7
2.3.1	Fastfaseekstraksjon - SPE (<i>Solid Phase Extraction</i>)	7
2.3.2	Væske-væske-ekstraksjon - LLE (<i>Liquid Liquid Extraction</i>)	8
2.3.3	Proteinfelling og fosfolipidfjerningsplater	9
2.4	Kromatografi	11
2.4.1	Væskrokromatografi	11
2.4.2	Kolonner	11
2.4.3	Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)	12
2.4.4	Mobilfaser	13
2.5	Massespektrometer	14
2.5.1	Elektrosprayionisering	14
2.5.2	Masseanalysator	15
2.5.3	Tandem-kvadrupol	15
2.6	Matrikseffekter	17
2.7	Kvantitative analyser	17
2.7.1	Topp høyde og toppareal	17
2.7.2	Intern-standard	17
2.8	Validering	20
2.8.1	Standarder og kvalitetskontroller	20
2.8.2	Kalibreringskurver	20
2.8.3	Deteksjons- og kvantifiseringsgrense	20
2.8.4	Selektivitet	21
2.8.5	Nøyaktighet	21
2.8.6	Presisjon	21
2.8.7	Matrikseffekter	22
2.8.8	Holdbarhet	22
2.8.9	Robusthet	23

2.8.10	Overdrag	23
2.8.11	Ekstraksjonsutbytte	23
2.8.12	Retensjonstid	24
2.8.13	Spesifisitet	24
2.9	Akkreditering	25
2.9.1	Sammenlignende laboratorieprøving (SLP)	25
3	Materialer og metoder	26
3.1	Kjemikalier og utstyr	26
3.2	Tillaging av løsninger	29
3.2.1	Pasientprøver	31
3.3	Prøveopparbeidelse	31
3.4	Analysebetingelser	32
3.4.1	Gradientprogram	33
3.5	Databehandling	34
3.6	Prevalidering	36
3.7	Validering	37
3.7.1	Minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon (MDK og MKK)	37
3.7.2	Linearitet	37
3.7.3	Presisjon	37
3.7.4	Nøyaktighet	38
3.7.5	Selektivitet	38
3.7.6	Matrikseffekter	38
3.7.7	Ekstraksjonsutbytte	39
3.7.8	Overdrag	39
3.7.9	Robusthet	39
3.7.10	Variasjon i intern-standard	39
3.7.11	Holdbarhet	40
3.7.12	Ioneratio	40
3.7.13	Retensjonstid	40
3.7.14	Spesifisitet	40
3.7.15	Metodesammenligning	41
3.7.16	Samkjøring mellom instrumenter	41
4	Resultater og diskusjon	42
4.1	Metodeutvikling	42

4.1.1	Metodeutvikling MS	42
4.1.2	Metodeutvikling UHPLC-MS/MS	43
4.1.3	Kalibreringskurver	44
4.1.4	Kvalitetskontroller	45
4.1.5	Prosessering av kromatogrammene	45
4.2	Prevalidering	47
4.3	Validering	48
4.3.1	Minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon	48
4.3.2	Linearitet	49
4.3.3	Repeterbarhet	50
4.3.4	Reproduserbarhet og nøyaktighet	51
4.3.5	Selektivitet	53
4.3.6	Matrikseffekter	53
4.3.7	Ekstraksjonsutbytte	55
4.3.8	Overdrag	55
4.3.9	Robusthet - tilsats av syre under opparbeidelse	56
4.3.10	Robusthet - drift i en analyseserie	57
4.3.11	Variasjon i intern-standard	57
4.3.12	Holdbarhet i opparbeidede kvalitetskontroller	58
4.3.13	Ioneratio	59
4.3.14	Retensjonstid	60
4.3.15	Spesifisitet	60
4.3.16	Metodesammenligning	60
4.3.17	Samkjøring mellom instrumenter	64
5	Konklusjon	66
	Referanser	67
A	Vedlegg	i
A.1	Kalibreringskurver	i
A.2	Kalibreringskurver med HøyStd	iii
A.3	Valideringsplan	v

Forkortelser

0-serum Serum fritt for analyttene

m/z Masse-ladningsforhold

ACN Acetonitril

AKF Avdeling for klinisk farmakologi

APCI Atmosfærisk trykk kjemisk ionisering, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

CV Variasjonkoeffisient, *Coefficient of Variation*

DCM Diklormetan, *Dichloromethane*

ESI Elektrosprayionisering

FAc Maursyre, *Formic acid*

GC Gasskromatografi, *Gas Chromatography*

HCl Saltsyre

HPLC High Performance Liquid Chromatography

HøyStd Høy standard, med konsentrasjon 200 % av høyeste standard

LC Væskeskromatografi, *Liquid Chromatography*

LC-MS Væskeskromatografi-massespektrometri, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LGC Laboratory of the Government Chemist

MDA 3,4-Metylendioksyamfetamin

MDK Minste detekterbare konsentrasjon

MDMA 3,4-Metylendioksymetamfetamin

ME Matrikseffekt

ME_{IS} Matrikseffekt korrigert med intern-standard

MeOH Metanol

MKK Minste kvantifiserbare konsentrasjon

MRM Multippel reaksjonsmonitorering, *Multiple Reaction Monitoring*

MS Massespektrometri

PMMA Parametoksymetamfetamin

RSD Relativt standardavvik, *Relative Standard Deviation*

S/N Signal-til-støy-forhold, *Signal-to-noise-ratio*

SDPA Standard Deviation for Proficiency Assessment

SIM Selektiv ionemonitorering, *Selective Ion Monitoring*

SLP Sammenlignende laboratorieprøving

TDM Terapeutisk legemiddelmonitorering, *Therapeutic Drug Monitoring*

UHPLC Ultra High Performance Liquid Chromatography

UHPLC-MS/MS Ultra High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

1 Introduksjon

Før midten av 1990-tallet ble gasskromatografi-massespektrometri (GC-MS) mye brukt i legemiddel- og rusmiddelanalyser. I GC bør analyttene være termotabile og flyktige. Legemidler og rusmidler er vanligvis ikke flyktige, og må derivatiseres for å kunne analyseres med GC. Utviklingen av ioniseringsteknikken elektrospøy på 1980-tallet muliggjorde koblingen mellom væskrokromatografi (LC) og MS, hvor væskestrømmen med høyt trykk i LC overføres til gassfase og vakuum i MS[1]. Dette forenklet prøveopparbeidelsen ettersom derivatisering ikke ble nødvendig. Etter dette har bruken av LC-MS hatt en sterk vekst innen legemiddel- og rusmiddelanalyser, og er den mest brukte teknikken i dag[2]. I tillegg gir bruk av tandem MS høy selektivitet og sensitivitet[3] ved analyser i biologiske matriser som blod, urin og spytt.

Sentralstimulerende midler brukes både som illegale rusmidler og til medisinsk bruk. Disse stoffene øker selvfølelsen, hever humøret, gir nedsatt matlyst, øker konsentrasjonsevnen og gir kritikkløshet[4, 5]. Metylfenidat og amfetamin, samt stoffer som er kjemisk beslektet, er de eneste av de sentralstimulerende stoffene som er godkjente som legemidler i Norge[4]. Disse stoffene brukes for å behandle ADHD og narkolepsi[5], men er underlagt strenge bestemmelser[4], ettersom det er stor fare for misbruk og avhengighet. Metylfenidat er det foretrukne legemiddelet til behandling av ADHD, men amfetamin kan også bli foreskrevet dersom metylfenidat gir problemer med bivirkninger eller ikke har tilstrekkelig effekt[6]. Eksempler på illegale rusmidler som er sentralstimulerende er ecstasy og metamfetamin[7].

Analysene som utføres ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St. Olavs hospital for sentralstimulerende stoffer i serum, gjennomføres enten for å avdekke misbruk av rusmidler eller for å undersøke om konsentrasjonen av de spesifikke legemidlene ligger innenfor bestemte referanseområder. Dette er kjent som terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM).

I min prosjektoppgave *Kvantifisering av amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i serum – bruk av pipetteringsrobot og UHPLC-MS/MS*[8] ble det utviklet en ny kvantitativ analysemetode for amfetamin, metamfetamin, 3,4-metylendioksymetamfetamin (MDMA), 3,4-metylendioksyamfetamin (MDA) og ritalinsyre i serum. I denne masteroppgaven ble metoden optimalisert ytterligere, før en valideringsplan (vedlegg A.3) ble skrevet og godkjent, og validering av analysemetoden ble gjennomført.

I dag analyseres disse analyttene ved AKF ved bruk av to ulike analysemetoder. Det ble i

fjor analysert til sammen 1500 prøver. Prøveopparbeidelsene for de eksisterende metodene er manuelle og det benyttes fastfase-ekstraksjon (SPE) og væske-væske-ekstraksjon (LLE). Dagens metoder for prøveopparbeidelse for disse stoffene er arbeidskrevende, med mange manuelle pipetteringstrinn. Dette øker risikoen for menneskelige feil og belastar armer og skuldrer. Automatisering av prøveopparbeidelsen ved bruk av Hamilton pipetteringsrobot vil gjøre metoden mindre arbeidskrevende og mindre utsatt for menneskelige feil.

I dagens metode med LLE brukes det organiske løsemiddelet diklormetan (DCM). Dette stoffet mistenkes å være kreftfremkallende[9]. Det er derfor ønskelig å erstatte prøveopparbeidelsen med en metode som ikke bruker DCM, slik at metoden blir mindre skadelig for de som jobber med den. Dette er i samsvar med substitusjonsplikten gitt av Miljødirektoratet som sier at dersom *«virksomheten bruker et produkt som inneholder kjemiske stoffer som kan medføre helseskade eller miljøforstyrrelse, skal den vurdere om det finnes alternativ som medfører mindre risiko for slik virkning»*[Miljødirektoratet, 2015, [10]].

De eksisterende metodene krever relativt store prøvevolum (0,5-1 ml). Dersom en pasientprøve skal analyseres med flere ulike analysemetoder, kan det være et problem å få nok prøvevolum til alle analysene. Det er derfor en fordel at den nye metoden bruker mindre prøvevolum. Dette gjør også at det kreves mindre løsemiddel i opparbeidelsen, og dette er positivt ut i fra et HMS-perspektiv. I de eksisterende metodene benyttes sju kalibreringsnivåer til kalibreringskurvene. Antall kalibreringsnivåer er redusert i den nye metoden.

I dagens metoder benyttes LC-MS til analyse av amfetaminene og ritalinsyre. Ved å ta i bruk UHPLC-MS/MS i den nye metoden, kan en enklere prøveopparbeidelse gjennomføres, på grunn av høyere selektivitet og sensitivitet. Nye ^{13}C -merkede intern-standarder for alle analyttene bortsett fra ritalinsyre, ble undersøkt. For ritalinsyre ble en deuterium-merket intern-standard med færre ^2H enn i eksisterende metode undersøkt. Enklere prøveopparbeidelse gjør at prøven inneholder flere matrikskomponenter, og analysen er derfor mer utsatt for matrikseffekter. De stabile isotopmerkede intern-standardene har som oppgave å korrigere for blant annet matrikseffekter.

Utvikling av nye analysemetoder krever at metoden valideres. Dette er viktig for å verifisere og dokumentere at analysemetoden eger seg til sitt formål[11]. Validering innebærer blant annet å undersøke metodens nøyaktighet, deteksjonsgrenser, presisjon, selektivitet, sensitivitet og usikkerhet[11].

1.1 Målene med oppgaven

- Utvikle en ny sensitiv og selektiv analysemetode for amfetamin, metamfetamin, MDA, MDMA og ritalinsyre i serum ved bruk av UHPLC-MS/MS.
- Effektivisere rutinedriften ved å slå sammen to eksisterende metoder til én.
- Effektivisere prøveopparbeidelsen ved å benytte enkel, rask og delvis automatisert prøveopparbeidelse med proteinfelling og fosfolipidfjerningsplater.
- Benytte ny deuterert intern-standard for ritalinsyre og nye ^{13}C -merkede intern-standarder for de øvrige analyttene.
- Utvikle en enkel og robust metode som kan håndtere et stort antall prøver i rutinedrift.
- Redusere prøvevolum, analysetid, antall kalibreringsnivåer og bruken av løsemidler. Erstatte den kreftfremkallende forbindelsen diklormetan fra opparbeidelsen jamfør substitusjonsplikten fra Miljødirektoratet[10].
- Utføre validering av metoden for å undersøke om metoden ligger innenfor akseptkriteriene for de ulike valideringsparametrene.

2 Teori

2.1 Legemiddel- og rusmiddelanalyser

Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) kan brukes ved behandling med legemidler som har et smalt terapeutisk vindu. Det terapeutiske vinduet er et definert referanseområde som anslår hvor høy konsentrasjon pasienten bør ha i kroppen for at legemiddelet skal ha terapeutisk effekt og virke optimalt. Konsentrasjoner over referanseområdet kan være toksiske. Analyse av blodprøver fra pasienter under behandling viser hvilken konsentrasjon pasienten har i kroppen, og dermed om dosen bør endres[12].

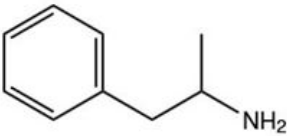
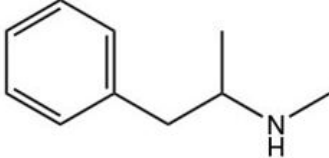
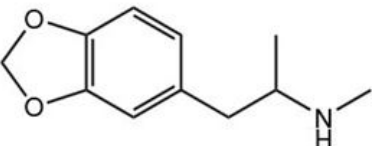
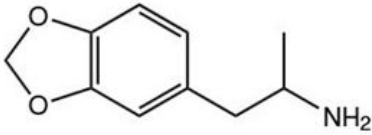
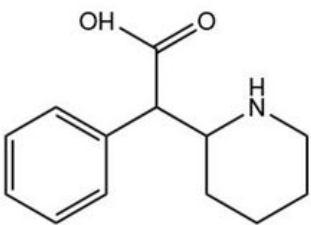
Urinprøver er foretrukket for å avdekke misbruk av rusmidler, da rusmidler i urin har et større tidsvindu de er detekterbare i sammenlignet med blod. I blod metaboliseres forbindelsene raskt, mens i urin kan forbindelsene detekteres flere dager etter inntak[13]. I tillegg er det mindre krevende å innhente urinprøver enn blodprøver. Til blodprøvetaking kreves det autorisert personell, mens urinprøver skal tas under oppsyn. I noen tilfeller hvor det ikke mulig å ta urinprøver kan blodprøver brukes til å avdekke misbruk av illegale rusmidler eller legemidler[14].

2.2 Analyttene

Analyttene som inngår i den nye kvantitative analysemetoden er de fem sentralstimulerende stoffene amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA og ritalinsyre. Deres kjemiske molekylstrukturer, måleområde, molekylvekt og pK_a er presentert i tabell 2.1. Ved bruk av amfetamin og ritalinsyre som legemidler er referanseområdene henholdsvis 250-1100 nM, og 1000-4000 nM.

2. TEORI

Tabell 2.1: Molekylstrukturer, molekylvekt, måleområde og pK_a -verdier for amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA og ritalinsyre

Analytt	Struktur	Mw ¹	pKa ¹	Måleområde [nM]
Amfetamin		135,2	10,1	25-2000
Metamfetamin		149,2	9,87	25-2000
3,4-metylendioksymetamfetamin (MDMA)		193,2	10,14 ^A	25-1000
3,4-metylendioksyamfetamin (MDA)		179,2	9,7 ^C	25-1000
Ritalinsyre		219,3	3,73 ^B 10,08 ^A	200-5000

1) www.drugbank.ca

A) Sterkeste base, teoretisk verdi (www.drugbank.ca)

B) Sterkeste syre, teoretisk verdi (www.drugbank.ca)

C) <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9623EN.pdf>

Alle stoffene i denne oppgaven er aromatiske og har en amingruppe. De har likheter i oppbygning, men den største forskjellen er at ritalinsyre har en syregruppe. Amfetamin er metabolitten til metamfetamin. Derfor kan påvisning av amfetamin i blodprøver skyldes både inntak av metamfetamin som er blitt metabolisert, og direkte bruk av amfetamin. Metamfetamin blir ikke benyttet til medisinsk bruk, og påvisning av dette stoffet vil derfor bety inntak fra en illegal kilde.

2. TEORI

MDA er metabolitten til MDMA. MDMA er det mest kjente virkestoffet i ecstasy[15], men ecstasy kan inneholde både MDMA og MDA. Analyser av disse stoffene gjennomføres derfor for å avdekke illegalt bruk av ecstasy.

Metylfenidat metaboliseres til den inaktive metabolitten ritalinsyre. Metylfenidat brukes som ADHD-medisin[4], og maksimal plasmakonsentrasjon oppnås etter 1-2 timer. Metabolitten ritalinsyre har dobbelt så lang halveringstid som metylfenidat[16]. Metylfenidat er lite holdbar i plasma[17] og serum[18], og ritalinsyre er derfor bedre egnet til analyser i blodprøver. Ritalinsyre skiller seg kjemisk fra de andre analyttene ved at den er amfotær, og kan reagere som syre og base[19]. Både amfetamin og metylfenidat brukes som legemidler til behandling av ADHD, men stoffene er også aktuelle i misbrukssaker. På grunn av dette ble disse analyttene samlet i en felles analysemetode.

2.3 Prøveopparbeidelse

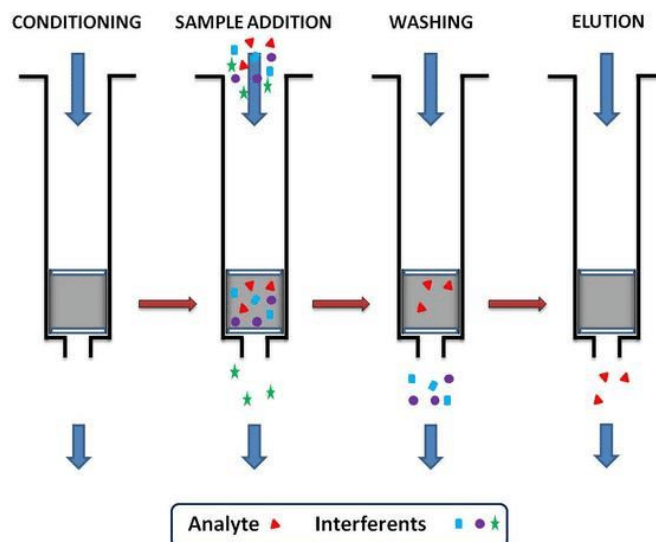
Prøveopparbeidelse er viktig når blod- og serumprøver skal analyseres. Blod har en kompleks sammensetning, og må derfor prepareres før prøvene kan injiseres på analysekolonnen. Både blod og serum inneholder matrikskomponenter som kan tette kolonnene, interferere i kromatogrammene eller undertrykke/forsterke analyttsignalet[20].

Matrikskomponenter som elueres samtidig med analyttene kan påvirke ionisering av analyttene i ionekilden. Da blir signalet delvis undertrykt eller forsterket, og den kvantitative bestemmelsen kan bli unøyaktig. Dette er kjent som ioneundertrykkelse eller ioneforsterking. Matrikskomponenter i prøvene bør derfor reduseres under prøveopparbeidelse. Fosfolipider er de viktigste fettstoffene i cellemembranen[21] og finnes dermed i serum. Disse er kjent for å gi ioneundertrykkelse og ioneforsterking. [20]

Væske-væske-ekstraksjon (LLE) og fastfase-ekstraksjon (SPE) er blitt mye brukt ved prøveopparbeidelse av biologiske prøver[22]. Disse teknikkene gir som regel prøveekstrakt med få interfererende forbindelser. Ved bruk av enklere prøveopparbeidelsesteknikker vil flere matrikskomponenter forbli i prøvene. Utviklingen av mer sensitive og selektive instrumenter, som tandem massespektrometer, har gjort at enklere prøveopparbeidelse kan gjennomføres. Proteinfelling i kombinasjon med fosfolipidfjerningsplater er en enkel teknikk som er godt egnet til automatisering med pipetteringsrobot.

2.3.1 Fastfaseekstraksjon - SPE (*Solid Phase Extraction*)

SPE utnytter prinsippet om at analytten adsorberes på et fast materiale, mens de uønskede forbindelsene vaskes bort, som vist i figur 2.1. Analyttene elueres ved å tilsette en eluent som bryter interaksjonen til stasjonærfasen. Analyttene vil ende opp i eluenten. I eluenten vil mange av matrikskomponentene være fjernet[20].

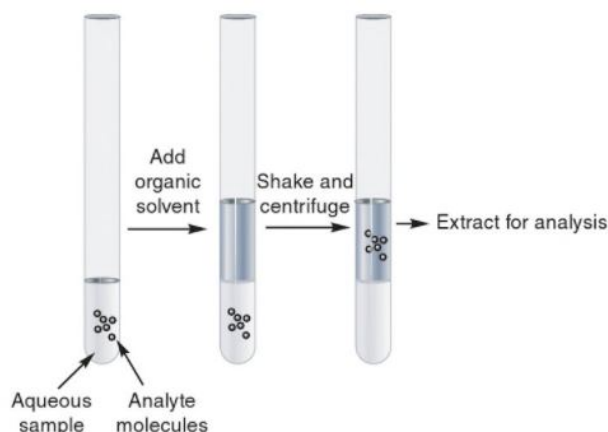


Figur 2.1: Prinsippet for fastfaseekstraksjon[23]

I AKF sin eksisterende metode for ritalinsyre brukes SPE i *mixed mode* med en sterk kationbytter. I *mixed mode* benyttes både prinsippet om ionebytte- og reversfase-ekstraksjon. Det finnes flere publiserte artikler som også bruker SPE til prøveopparbeidelse av amfetaminene. M. K. Bjørk et al. [24] har utviklet en kvantitativ analysemetode for 31 legemidler og illegale rusmidler i blod. I denne metoden inngår amfetamin, metamphetamine, MDMA og MDA, og SPE med sterk kationbytter i *mixed mode* blir brukt under prøveopparbeidelsen.

2.3.2 Væske-væske-ekstraksjon - LLE (*Liquid Liquid Extraction*)

Ved LLE er målet å ekstrahere analyttene over fra en vandig løsning til et organisk ekstraksjonsmiddel. Urin, blod og serum er alle vandige løsninger. Prinsippet er at de uønskede matrikskomponentene skal forbli i vannfasen, mens analyttene overføres til den organiske fasen[20], som vist i figur 2.2.



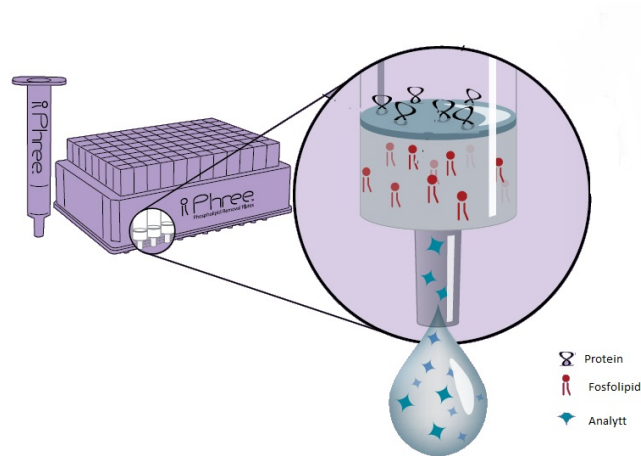
Figur 2.2: Prinsippet for væske-væske-ekstraksjon[20]

I dagens rutinemetode ved AKF brukes LLE ved prøveopparbeidelse av amfetamin, metamfetamin, MDMA og MDA. Diklormetan og 2-propanol (90+10) brukes som ekstraksjonsmiddel. Også Fernández et al.[25] har brukt LLE ved prøveopparbeidelse av amfetamin, metamfetamin, MDMA og MDA i plasma. Etylacetat ble brukt som ekstraksjonsmiddel.

2.3.3 Proteinfelling og fosfolipidfjerningsplater

Under prøveopparbeidelse med proteinfelling tilsettes et fellingsreagens, ofte acetonitril, med tre eller fire ganger større volum enn prøven. Proteinene denatureres og felles ut[20]. Da kan proteinene separeres fra løsningen med enten sentrifugering eller filtrering. Med optimal proteinfelling fjernes tilnærmet 100 % av plasmaproteinene, men mange andre matrikskomponenter forblir i løsningen. Fosfolipider er forbindelser som ikke vil bli fjernet med kun felling og sentrifugering[20]. For å fjerne fosfolipidene kan det brukes 96-brønns fosfolipidfjerningsplater.

Prøvene og fellingsreagenset blir tilsatt brønnene, og proteinene felles ut på oversiden av filteret. Løsningen suges eller presses så gjennom filteret, enten med vakuum eller positivt trykk. De denaturerte proteinene legger seg på oversiden av pakningsmaterialet, mens fosfolipidene binder seg til det. Analyttene og fellingsreagenset passerer gjennom, som vist i figur 2.3. Filtratene samles opp i oppsamlingsplater som settes under filterplaten. Bruk av 96-brønnsplater er enkelt å automatisere og implementere på roboter.



Figur 2.3: Prinsippet i fosfolipidfjerningsplater [26].

I denne oppgaven benyttes proteinfelling og fosfolipidfjerningsplater til prøveoppbeidelse. Det finnes flere publiserte artikler som også har benyttet denne type prøveoppbeidelse av de samme analyttene som inngår i metoden i denne oppgaven. M. Sergi et al. [27] har beskrevet analyser av analytter fra ulike kjemiske klasser hvor amfetamin, metamfetamin og MDMA inngikk i metoden. Her ble det brukt proteinfelling og polytetrafluoretylen-filter. M. Nilsen[28] har som i denne oppgaven benyttet proteinfelling og fosfolipidfjerningsplater ved prøveoppbeidelse av amfetaminer i blod.

2.4 Kromatografi

Væskekromatografi (LC) er den mest brukte analyseteknikken for bestemmelse av rusmidler og legemidler i biologiske prøver. Det benyttes også gasskromatografi (GC) og immunoassays.

I gasskromatografi separeres forbindelser etter kokepunkt. Det er nødvendig at analyttene er flyktige og kan gå over i gassfase, samt er termisk stabile. Forbindelser med svært høye kokepunkt må derfor derivatiseres for å kunne analyseres med GC. Da blir forbindelsen kjemisk endret til en ny forbindelse med lavere kokepunkt som kan injiseres i GC. Legemidler er som regel polare og ikke flyktige. Fordelen med væskekromatografi er at analyttene ikke trenger å være flyktige, og trenger derfor heller ikke å derivatiseres. I tillegg er biologiske forbindelser ofte ikke termisk stabile og vil dekomponere under oppvarming. De er derfor ikke egnet til analyser med GC.

2.4.1 Væskekromatografi

I væskekromatografi trykkes mobilfasen gjennom en kolonne med et pakningsmateriale som retarderer analyttene. Analyttene injiseres i mobilfasen rett før kolonnen, og utgangen av kolonnen er koblet til en detektor. Ulike separasjonsprinsipper kan brukes i kolonnen, for eksempel normalfase- eller omvendtfase-kromatografi[20]. I denne oppgaven blir det brukt omvendtfase-kromatografi, der mobilfasen mer polar enn stasjonærfasen. For normalfase-kromatografi er det motsatt.

2.4.2 Kolonner

Kolonnene i væskekromatografi har forskjellige pakningsmaterialer, som gir ulik selektivitet til ulike analytter. Mest vanlig i omvendtfase-kromatografi er kolonner med hydrokarbonkjeder (ofte C_{18}) bundet til silika[29]. Dette er upolare kolonner som retarderer upolare stoffer mest på grunn av hydrofobe interaksjoner. De er mekanisk sterke, men har et begrenset pH-område de egner seg i. Disse kolonne fungerer som regel best når pH er mellom 2 og 8. Med $pH < 2$ vil pakningsmaterialet hydrolyseres. Med $pH > 8$ vil hydroksidioner angripe og løse silikaen[30], noe som fører til haledannelse. Dette påvirker nøyaktigheten og presisjonen av kvantifiseringen. Disse angrepene motstår kolonnen i større grad dersom den er bundet til trifunksjonelle eller sterisk hindret monofunksjonelle silaner[31].

I Waters BEH TechnologyTM består kolonnene av silikapartikler som er etylen-bro-hybridiserte [31]. I BEH C₁₈-kolonnen er C₁₈-kjeden bundet med trifunksjonelle bindinger til den modifiserte silikapartikkelen. Denne kolonnen kan operere under ekstreme forhold, og allikevel gi lang levetid og høy effektivitet. Kjemisk modifisering av silikapartikler gir økt kjemisk stabilitet, og partiklene er stabile i pH-området 1-12[31]. Denne kolonnen er derfor godt egnet til bruk av basiske mobilfaser. BEH C₁₈-kolonnen brukes i denne oppgaven.

Forkolonner brukes som beskyttelse for å forlenge levetiden til den analytiske kolonnen. De er pakket med det samme materialet og har samme indre diameter, men er kortere enn analytiske kolonner (2-5 mm). Forkolonnene skal fjerne partikulære og kjemiske urenheter [32] uten å endre ytelsen til kolonnen. Fordelen er at forkolonnene enkelt kan skiftes ut når ytelsen blir lavere.

2.4.3 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

I High Performance Liquid Chromatography (HPLC) pumpes mobilfasen gjennom kolonnen med et trykk opp til 400 bar. Partiklene i kolonnen er som regel mellom 3 og 5 µm. I Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) er partiklene i kolonnen < 2 µm. Mottrykket i UHPLC-kolonner blir mye høyere sammenlignet med kolonnene i HPLC. Disse kolonnene må være laget for å tåle trykk opp til 1500 bar og ha pumper som tåler å jobbe med dette mottrykket.

På grunn av mindre partikler og dermed lavere platehøyde i kolonnen i UHPLC kan lengden på kolonnen reduseres, uten at det går ut over effektiviteten. Effektiviteten måles i platetall (N), og er avhengig av lengden til kolonnen (L) og partikkeldiameteren (d_p) gjennom ligning 2.1

$$N \propto \frac{L}{d_p} \quad (2.1)$$

Ved bruk av kortere kolonner kan analysetiden forkortes. I tillegg vil forbruket av mobilfase reduseres. Injeksjonsvolumene i UHPLC er som regel redusert i forhold til HPLC. De kromatografiske toppene blir smalere i UHPLC enn i HPLC, og dette gir bedre separasjon og høyere sensitivitet[33]. Deteksjonsgrensene blir dermed lavere[14].

2.4.4 Mobilfaser

Valg av mobilfase påvirker retensjonen til analyttene. Analyttenes interaksjoner med kolonnen endres dersom pH i mobilfasen endres. For ioniserbare analytter vil pH-endringer ha stor innvirkning på selektiviteten. Forbindelser befinner seg i nøytral eller ionisert form avhengig av pH i forhold til pK_a . I omvendtfase-kromatografi vil analytter i ionisert form retarderes mindre enn analytter i nøytral form[30].

Polariteten til mobilfasen vil også påvirke interaksjonen mellom analytt og pakningsmaterial. I gradientprogrammer for omvendtfase-kromatografi er det vanlig å bruke enten metanol eller acetonitril som organisk fase. Disse har forskjellige elueringsstyrker, hvor acetonitril er den sterkeste. I tillegg er selektiviteten forskjellig[34]. Alle disse faktorene påvirker retensjonstiden til analyttene.

2.5 Massespektrometer

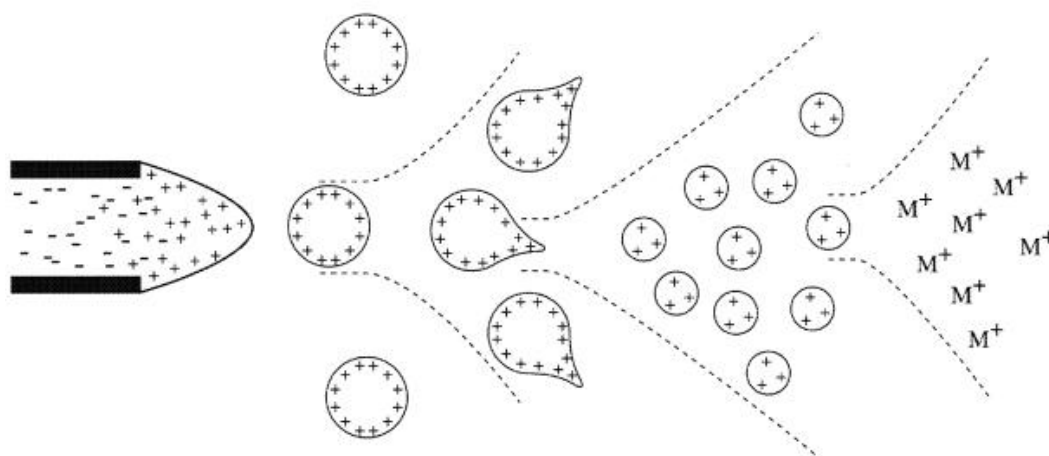
Detektorer som ofte er koblet til LC er massespektrometre eller UV-detektorer. Fordelene med å bruke massespektrometri (MS) i forhold til UV er at spesifisiteten er bedre og sensitiviteten er 10[35] til 100[36] ganger høyere. LC-MS ble ikke kommersielt tilgjengelig før midten av 1990-tallet på grunn av utfordringene med overføringen mellom væskestrøm med høyt trykk i LC til gassfase og vakuum i MS[1]. Den høye sensitiviteten og spesifisiteten har gjort LC-MS til dagens mest brukte analyseteknikk innen legemiddel- og rusmiddelanalyser.

I et massespektrometer separeres og detekteres forbindelser på bakgrunn av deres forhold mellom masse og ladning (m/z). Massespektrometeret består av tre hovedkomponenter: ionekilde, masseanalysator og detektor. I ionekilden ioniseres komponentene, i masseanalysatoren separeres ionene på bakgrunn av masse-ladningsforhold og i detektoren blir ionene detektert og oversatt til elektriske signaler.

2.5.1 Elektrosprayionisering

I ionekilden ioniseres analyttene og overføres til gassfase[20]. Det finnes flere ioniserings-teknikker, men i LC-MS er det mest vanlig å bruke elektrospray (ESI) eller atmosfærisk trykk kjemisk ionisering (APCI)[29].

ESI brukes i hovedsak til forbindelser som inneholder polare funksjonelle grupper[29]. Elektrospray produseres ved påføre et elektrisk felt til væske som passerer gjennom et kapillær. Ved utgangen av kapillæret blandes væsken med en spray-gass, og danner en aerosol. Dette er en fin spray av små, ladede dråper. Ved hjelp av en tørkegass og forhøyede temperaturer blir disse dråpene mindre og mindre, ettersom løsemiddelet fordamper[37]. Når de frastøtende kreftene inne i dråpene overgår overflatespenningen, eksploderer dråpene til mindre dråper. Dette skjer om og om igjen, helt til ionene går over i gassform[29], slik figur 2.4 viser.



Figur 2.4: Mekanisme for å overføre ioner til gassfase ved bruk av elektrospray[37]

Ionene får enten positive eller negative ladninger, avhengig av hvilket modus instrumentet settes i. I kapillæret dannes dråper med valgt ladning, og motsatt ladning utlades. I positivt modus overføres et proton eller et annet kation til analytten, og ved protonoverføring får ionet som dannes en masse som betegnes $[M+H]^+$. I negativt modus gir analytten fra seg et proton, og ionet som dannes får en masse som betegnes $[M-H]^-$.

2.5.2 Masseanalysator

Det finnes flere ulike masseanalysatorer, hvor de mest vanlige i dag er kvadrupol, ionefelle og *time-of-flight* (TOF). I denne oppgaven benyttes kvadrupoler. De består av fire parallelle strømlerende staver. Mellom disse er det en parvis spenning av et konstant bidrag og et oscillerende bidrag med motsatt polaritet. Den spesifikke spenningen og frekvensen som settes på stavene gjør at ioner med et bestemt m/z -forhold passerer gjennom, og kvadrupolen fungerer dermed som et massefilter. Både positive og negative ioner kan transporteres i kvadrupolen, avhengig av innstillingene. Kvadrupoler kan benyttes både som singel-kvadrupol og tandem-kvadrupol.

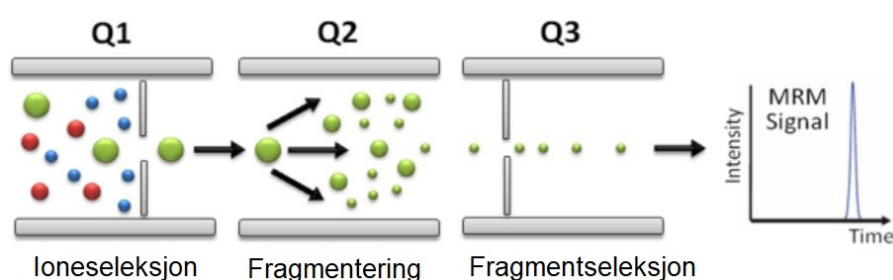
2.5.3 Tandem-kvadrupol

En tandem-kvadrupol består av to kvadrupoler med en kollisjonscelle i mellom. I den første kvadrupolen velges ett karakteristisk m/z -forhold for analyttens molekylion, kalt

2. TEORI

moderion, som transporteres til kollisjonscellen. Det er derfor ikke ønskelig at moderionet fragmenteres i ionekilden.

I kollisjonscellen fragmenteres moderionet til datterioner. Her utsettes moderionet for en inert gass av argon eller nitrogen, som kolliderer med ionene slik at bindinger brytes, og ionene fragmenteres. Dette er *Collision-induced dissociation*(CID). Datterionene selekteres i den neste kvadrupolen, og transporteres til detektoren. Detektoren oversetter ionene til elektriske signaler som plottes som kromatogram, hvor signalet er proporsjonalt med mengden ioner som er detektert. Figur 2.5 viser en oversikt over en tandem-kvadrupol.



Figur 2.5: Oppbygning av tandem-kvadrupol [38]

2.5.3.1 Innstillinger i MS

Singel-kvadrupoler kan opereres med ulike innstillinger. Skanning brukes til å analysere et større m/z -område, for å undersøke fragmenteringen til en analytt. I selektiv ionemonitorering (SIM) slippes kun ioner med utvalgte m/z -forhold gjennom kvadrupolen. SIM blir som regel brukt til kvantifisering i singel-kvadrupoler, hvor moderion og fragmenter blir detektert.

I tandem-kvadrupoler benyttes ofte multipel reasjonsmonitorering (MRM) til kvantitative analyser. Da detekteres flere datterioner samtidig. Det gjøres et utvalg der det ene datterionet benyttes til kvantifisering (kvantifiseringsion) og det andre til bekreftelse av identitet (kvalifiseringsion). Forholdet mellom disse ionene kalles ioneratioen. Kvalifiseringsion brukes når bekreftelse av identitet er viktig, som for eksempel i misbruksanalyser. Tandem-kvadrupoler gir høyere selektivitet og sensitivitet enn singel-kvadrupoler, og er derfor godt egnet til legemiddel- og rusmiddelanalyser.

2.6 Matrikseffekter

LC-MS/MS er en analyseteknikk med høy selektivitet. Forbindelser som befinner seg i prøven, men har andre masser og fragmenter enn de definerte MRM-overgangene vil filtreres bort i tandem-kvadrupolen. Disse forbindelsene kan derimot påvirke ionisasjonsgraden av analyttene i ionekilden. Denne effekten, som kalles matrikseffekt, vil kunne påvirke deteksjonen av analyttene[39]. Matrikseffektene kan gi både ioneundertrykkelse og ioneforsterkning, og dette påvirker metodens nøyaktighet, presisjon og robusthet[39]. Matrikseffektene i en prøve kan undersøkes ved å måle forskjellen mellom respons i MS for analyttløsning uten matriks mot analytt løst i matriks.

2.7 Kvantitative analyser

2.7.1 Topphøyde og toppareal

En detektor skal gi en respons, det vil si et elektrisk signal, for de stoffene som ønskes identifisert og/eller kvantifisert. Responsen skal være proporsjonal med konsentrasjonen av stoffet i mobilfasen. Kvantitative analyser utføres ved måling av topphøyde eller toppareal.

Integrering av toppene i kromatogrammene gir toppareal og topphøyde. Toppene skilles fra baselinjen ved hjelp av stigningstallet til linjen. Denne parameteren kalles topp-terskelen, og definerer hvor integreringen begynner og slutter på den kromatografiske toppen. Ved å angi denne terskelen for lav vil bakgrunnsstøy bli inkludert i integreringen. Settes terskelen for høyt vil for lite av toppen bli integrert og små topper ikke bli detektert[40].

I artiklene til McCoy et al. [41, 42] sammenlignes presisjonen til kvantifisering ved bruk av toppareal og topphøyde. Studiene er gjennomført ved henholdsvis 50 og 42 laboratorier. De undersøkte to løsninger med fire analytter hver analysert med hjelp av LC-UV med isokratiske betingelser. Resultatene viste at areal gir høyere presisjon for topper med Gaussform. For topper som overlapper eller er dårlig oppløst fra grunnlinjeforstyrrelser viser resultatene at bruk av høyde gir mer nøyaktig kvantifisering av analyttene.

2.7.2 Intern-standard

For å øke presisjonen i kvantitative målinger brukes intern-standard-metoden. Denne metoden benyttes ofte til bestemmelse av analytter i biologiske prøver[14]. Dette er spesielt viktig under omfattende, manuell prøveopparbeidelse, med for eksempel ekstraksjon[14]. I

tillegg er intern-standarden viktig for korrigerende av matrikseffekter. Dette er spesielt gjeldende under enkel prøveopparbeidelse, hvor mange matrikskomponenter forblir i prøvene, men er også viktig i ekstraherte prøver.

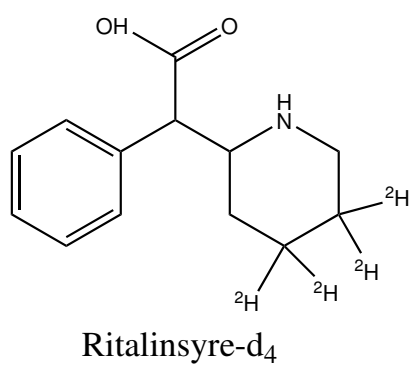
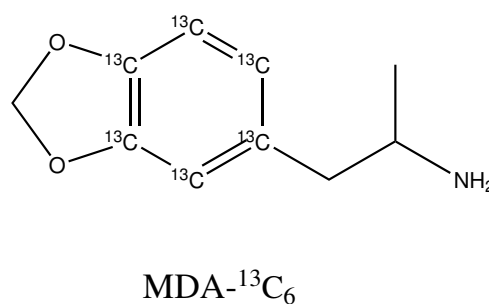
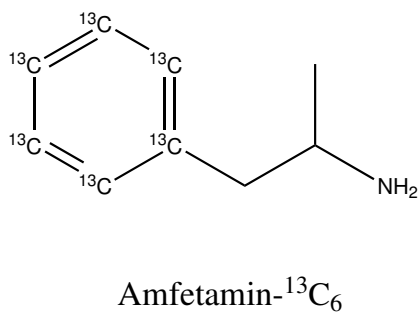
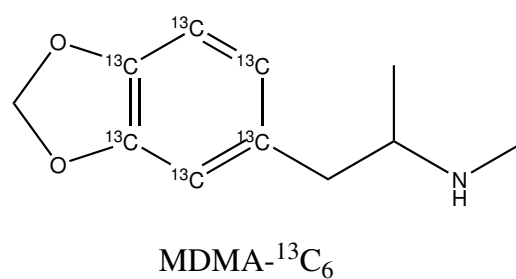
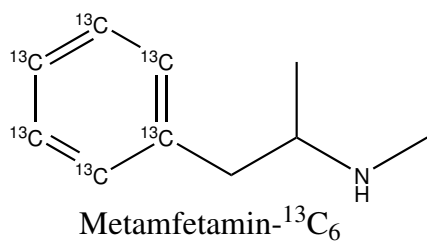
Samme mengde intern-standard tilsettes alle standarder, kvalitetskontroller og prøver før prøveopparbeidelse. Målet er at analytter og intern-standarder skal påvirkes i lik grad under opparbeidelse. Derfor gir forholdet mellom arealene av analytt og intern-standard et mer nøyaktig mål på konsentrasjonen i prøven. Dette gjør at tap av prøvemateriale under prøveopparbeidelsen og matrikseffekter i detektoren korrigeres for[20].

Intern-standarder bør ha så like som mulig fysiokjemiske egenskaper som analyttene. I LC-MS er det vanlig å bruke isotopmerkede intern-standarder, enten deutererte eller ^{13}C -merkede eller en kombinasjon av disse. Isotopmerkede intern-standarder har svært like egenskaper som analyttene, men har en høyere masse, som gjør at de kan skilles i MS. I deutererte intern-standarder substitueres ^1H med ^2H . Dette representerer en masseøkning på 100 % for den aktuelle substituenten. I ^{13}C -merkede intern-standarder derimot, hvor ^{12}C substitueres med ^{13}C , representerer dette bare en økning i masse på 8 %[43]. Dette fører til at ^{13}C -merkede intern-standarder er mer like analyttene enn deutererte intern-standarder, og vil derfor generelt oppføre seg mer likt i kromatografisk separasjon.

T. Berg et al.[43] undersøkte i 2011 ^{13}C -merkede og ^2H -merkede intern-standarder for amfetamin og metamfetamin i urin. Studien viste at de ^{13}C -merkede intern-standardene eluerte mer likt med analyttene enn de ^2H -merkede. Studien konkluderte også at de ^{13}C -merkede korrigerer bedre for ioneundertrykkelse. Antallet deutererte hydrogen i forbindelsen spiller også en rolle. Et større antall ^2H ga større forskjell mellom retensjonstiden til analytten og dens intern-standard. T. Berg et al.[44] studie fra 2014 undersøkte flere nye ^{13}C -merkede intern-standarder, blant annet MDMA og MDA. Resultatene støttet funnene i artikkelen fra 2011. I tillegg ble det konkludert at det ikke er noen forskjell mellom ekstraksjonsutbytte for deutererte og ^{13}C -merkede intern-standarder.

På bakgrunn av disse resultatene ble det valgt å benytte ^{13}C -merkede intern-standarder for de analyttene hvor de er kommersielt tilgjengelige. Disse er presentert i figur 2.6. For ritalinsyre var det ingen ^{13}C -merket intern-standard tilgjengelig. Derfor ble den deutererte intern-standarden ritalinsyre- d_4 brukt.

2. TEORI



Figur 2.6: Molekylstrukturer for ^{13}C -merket amfetamin, metamfetamin, MDMA og MDA, og deuterert ritalinsyre- d_4 .

2.8 Validering

For å undersøke om analysemetoder fungerer til sitt formål, utføres validering etter endt metodeutvikling[11]. Dette er et viktig ledd i kvalitetssikring av resultater. Validering innebærer å teste faktorer som kan innvirke på metodens pålitelighet og reproducerbarhet[45]. Viktige parametre er nøyaktighet, presisjon, selektivitet, matriskeffekter, reproducerbarhet og holdbarhet.

2.8.1 Standarder og kvalitetskontroller

Ved analyse av legemidler og rusmidler i biologiske prøver er det vanlig å bruke standarder og kvalitetskontroller. Disse består av referankestoff i bestemte konsentrasjoner tilsatt den aktuelle matriksen som skal undersøkes, for eksempel serum. Referankestoffene bør ha en kjent renhet, og helst være identiske med analyttene eller foreligge som salter[45].

Standarder brukes til å lage en kalibreringskurve. Kurven benyttes til kvantifisering av ukjente prøver. Kvalitetskontroller bør lages med referankestoff fra en annen produsent enn standardene. Disse opparbeides og analyseres sammen med standardene for å kvalitetssikre resultatene. Avviket kvalitetskontrollene lite i forhold til kalibreringskurven vil dette bety god nøyaktighet i analysene.

2.8.2 Kalibreringskurver

Standarder bør lages i samme matriks som prøvene. Ved AKF er det anbefalt med fem konsentrasjonsnivå fordelt jevnt utover analyttens måleområde (vedlegg A.3). For analyser av tre paralleller bør avviket være $< 15\%$ fra teoretisk verdi ($< 20\%$ for laveste standard). Den enkleste kurvetilpasningen som beskriver respons-konsentrasjons-forholdet tilfredsstillende bør benyttes. I denne oppgaven ble det benyttet kvadratisk kurvetilpasning.

2.8.3 Deteksjons- og kvantifiseringsgrense

Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) er definert som den laveste konsentrasjonen av analytt som med akseptabel sikkerhet kan detekteres med analysemetoden[14]. Til å bestemme MDK kan signal-til-støy-forhold (S/N) brukes. Den laveste konsentrasjonen som har $S/N > 3$ blir ofte definert som MDK. Nedre kvantifiseringsgrense (MKK) er definert

som den laveste konsentrasjonen analytten kan kvantifiseres med en viss sikkerhet[46] MKK blir ofte satt til den laveste konsentrasjonen som har $S/N > 10$ [29].

I denne oppgaven er MKK satt lik den laveste standarden fordi det ut fra et medisinsk perspektiv er ikke interessant å undersøke lavere konsentrasjoner enn det definerte måleområdet. For å oppnå en robust metode har AKF satt et krav om at den laveste standarden skal ha $S/N > 30$ for kvantifiseringsionet og > 10 for kvalifiseringsionet.

2.8.4 Selektivitet

Selektivitet er definert som metodens evne til å kvantifisere analytten med andre forbindelser til stede. Dette kan være endogene forbindelser i matriksen, metabolitter eller andre legemidler eller rusmidler. For kromatografiske analyser, skal responsen i prøver uten analytten være < 20 % av responsen til den laveste standarden ved retensjonstiden til analytten. Dette sikrer at resultatene ikke er påvirket av interfererende forbindelser[47].

2.8.5 Nøyaktighet

Analysemetodens nøyaktighet er et mål på hvor mye gjennomsnittlige resultater for konsentrasjon avviker fra teoretisk konsentrasjon av analytt. Nøyaktigheten bestemmes ved å analysere minst fem serier av kvalitetskontroller ved lavt, middels og høyt konsentrasjonsnivå innen måleområdet til analytten. Avvik for gjennomsnittet (absoluttverdi) av konsentrasjon bør være < 15 % fra den teoretiske konsentrasjonen. For laveste standard kan avvik opp til 20 % aksepteres[45].

2.8.6 Presisjon

Presisjon er definert som variasjon i målingene til en analytt, når samme prosedyre utføres flere ganger. Det uttrykkes som relativt standardavvik (RSD), også kjent som variasjonskoeffisient (CV)[48]. RSD (%) beregnes ut fra ligning 2.2.

$$RSD (\%) = \frac{STD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.2)$$

hvor STD er standardavvik beregnet fra ligning 2.3 og \bar{x} er gjennomsnitt av målinger. N er antall målinger.

$$STD = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (2.3)$$

Presisjon undersøkes i denne oppgaven ved å se på variasjon mellom analyseserier utført på forskjellige dager og med ulike personer (reproduserbarhet) og innen samme serie (repeteterbarhet). Medisinskfaglig ansvarlig for utvikling av den nye analysemetoden har satt de anbefalte kriteriene for RSD til å være $< 15\%$ for reproduserbarheten og $< 10\%$ for repeteterbarheten.

2.8.7 Matrikseffekter

Det finnes ulike metoder for å undersøke matrikseffekter. I denne oppgaven benyttes metoden beskrevet av Matuszewski[49]. Matriksprøver fra ulike personer tilsettes analytten og opparbeides og analyseres. Resultatene sammenlignes med analyser av analyttløsningen uten matriks.

Intensitet (areal/høyde) benyttes til beregning av matrikseffekter (ME) ved ligning 2.4. ME på 100 % betyr ingen ioneundertrykkelse eller ioneforsterkning.

$$ME = \frac{Intensitet_{matriksprøve}}{Intensitet_{analyttløsning}} \cdot 100 \quad (2.4)$$

Korrigert med intern-standard blir matrikseffekter beregnet ved ligning 2.5

$$ME_{IS} = \frac{Intensitet_{matriksprøve}/IS-intensitet_{matriksprøve}}{Intensitet_{analyttløsning}/IS-intensitet_{analyttløsning}} \cdot 100 \quad (2.5)$$

I følge retningslinjene ved AKF bør matrikseffekter korrigert med intern-standard være mellom 75-125 %, med RSD $< 15\%$ for alle analyttene.

2.8.8 Holdbarhet

Holdbarhet til analyttene bør undersøkes under validering. Holdbarhetsforsøk bør reflektere forholdene som kan oppstå under prøvehåndtering og analyse. Aktuelle forsøk er holdbarhet under prøvehåndtering, langtidslagring (fryst), korttidslagring (tint) og opparbeidede prøver. Også holdbarheten til stamløsningen bør undersøkes. I alle tilfellene sammenlignes resultatene med nylig lagde kvalitetskontroller. Avvik fra de nye kvalitetskontrollene bør være $< 15\%$.

2.8.9 Robusthet

Under metodeutvikling er det viktig å utvikle en robust metode. Definisjonen på robusthet refererer til metodens evne til å ikke bli påvirket av små variasjoner i metodeparametrene[50]. FDA beskriver ikke robusthetstesting som et forsøk i deres retningslinjer[45]. González et al.[48] har undersøkt et utvalg artikler innen validering i bioanalyser fra 2008 til 2013, og anslår at 20 % av artiklene undersøker robustheten til metoden. Forfatterne forklarer mangelen på robusthetstesting med at veiledningene som følges ikke krever det. Presisjon, oppløsning eller symmetri til toppene brukes som et mål på robusthet, ved endring av strømningshastighet, kolonnetemperatur, pH i bufferen og andel organisk fase i mobilfasen.

Robusthetsparametre som skal undersøkes i denne oppgaven er drift i en analyseserie og variasjon i konsentrasjonen av syren som tilsettes under prøveopparbeidelse. Drift i instrumentet i løpet av en analyseserie er et kjent problem. Derfor undersøkes det hvor stor effekt dette har på resultatene. Syren kan bli stående lenge i flasken den oppbevares i, og kan fordampe eller bli forurenset. Dette vil påvirke konsentrasjonen. Derfor undersøkes det om denne parameteren har stor innvirkning på resultatene.

2.8.10 Overdrag

Overdrag er en type prøveforurensning som skjer i instrumentet, enten i injeksjonsnålen eller i kolonnen. Høye konsentrasjoner av analytter kan føre til at pakningsmaterialet i kolonnen blir overbelastet. Det kan medføre at analyttene blir gjenværende i kolonnen og smitter over i den neste prøven. Det samme gjelder i injeksjonsnålen. Da kan det bli detektert høyere konsentrasjoner enn det faktisk er i den neste prøven, og det kan gi falske positive resultat. Under validering undersøkes denne parameteren. Det er anbefalt at overdraget skal være $< 20\%$ av konsentrasjonen til laveste standard[45].

2.8.11 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbytte kan også undersøkes under validering. Dette er ikke en like viktig faktor som de nevnt over, så lenge repeterbarheten, reproducerbarheten og signalet er tilfredsstillende. Utbytte kalkuleres som prosent av responsen til analytten som opparbeides på vanlig måte (prøve), mot responsen til en negativ matriksprøve som opparbeides og tilsettes analytten til slutt (kontrollprøve). Til beregning av utbytte brukes intensiteten

(areal/høyde) som i ligning 2.6.

$$Utbytte (\%) = \frac{Intensitet_{prøve}}{Intensitet_{kontrollprøve}} \cdot 100 \quad (2.6)$$

Ved AKF er det anbefalt at utbytte skal være $> 70 \%$. Ved høy presisjon kan lavere utbytte aksepteres.

2.8.12 Retensjonstid

Stabiliteten til analyttenes retensjonstid undersøkes under validering. Relativ retensjonstid beregnes med ligning 2.7. Prosentvis avvik fra referanseprøve bør ikke overstige $\pm 1 \%$. I denne oppgaven blir gjennomsnittlig retensjonstid av standard 2 og 3 brukt som referanseprøve.

$$Relativ\ retensjonstid = \frac{Retensjonstid_{Analytt}}{Retensjonstid_{IS}} \quad (2.7)$$

2.8.13 Spesifisitet

Spesifisiteten til metoden undersøkes ved å analysere forbindelser som kan gi falske positive resultat. Forbindelser som har molekylvekt ± 1 g/mol i forhold til analyttene har størst sannsynlighet for å interferere. Det er derfor viktigst å undersøke disse forbindelsene.

2.9 Akkreditering

AKF er et akkreditert laboratorium etter den internasjonale standarden ISO 15189. «*Akkreditering er en offisiell anerkjennelse av en organisasjons kompetanse og evne til å utføre angitte oppgaver i samsvar med gitte krav fra et internasjonalt anerkjent akkrediteringsorgan*» (Norsk akkreditering, 2014)[51]. ISO 15189 er en standard spesialtilpasset medisinske laboratorier. Denne brukes blant annet til akkreditering av prøvetaking og fortolkning av analysesvar. Akkreditering er med på å kvalitetssikre arbeidet, og sikre samsvar mellom laboratorier.

2.9.1 Sammenlignende laboratorieprøving (SLP)

Sammenlignende laboratorieprøving (SLP) er metode for å få laboratoriets kvalitet dokumentert ved akkreditering. Dette gir et mål på laboratoriets nøyaktighet sammenlignet med andre. Laboratorier som inngår i SLP-programmer mottar frysetørkede prøver for analyse fra profesjonelle tilbydere akkreditert etter NS-EN ISO/IEC 17043:2010. Resultatene sendes tilbake til tilbyderne, som sammenstiller resultatene fra ulike laboratorier. En rapport mottas hvor laboratoriets resultater er statistisk sammenlignet med resultatene fra de andre laboratoriene. Dette viser laboratoriets evne til å måle riktig[52].

Gode resultater i en runde med SLP utgjør ikke bevis for at laboratoriet presterer godt. På samme måte vil ikke ett dårlig resultat bevise at laboratoriet presterer dårlig. Derimot vil gjentatte dårlige resultater vise at prestasjonen er lav. I SLP-rapporten presenteres en gjennomsnittsverdi, beregnet fra resultatene fra de deltagende laboratoriene eller ved å bruke referanselaboratorier med høy pålitelighet. Ut i fra dette beregnes en Z-verdi for hver måling som sier noe om hvor mye resultatene avviker fra snittverdien. Alarmgrensen blir ofte satt til ± 2 og aksjonsgrensen på ± 3 [53]. *Standard Deviation for Proficiency Assessment* (SDPA) er standardavvik beregnet av SLP-leverandøren basert på de innrapporterte resultatene fra de ulike laboratoriene.

$$Z = \frac{\text{laboratoriets målte verdi} - \text{gjennomsnitt målt verdi alle deltakere}}{SDPA} \quad (2.8)$$

AKF deltar i et pågående SLP-program fra Laboratory of the Government Chemist (LGC) for ritalinsyre. Det finnes ikke tilgjengelige SLP-programmer for de øvrige analyttene i metoden. Resultatene fra SLP-prøvene for ritalinsyre vil gi indikasjon på om metoden har tilfredsstillende nøyaktighet.

3 Materialer og metoder

3.1 Kjemikalier og utstyr

Kjemikalier brukt i oppgaven er listet i tabell 3.1, analyttene i tabell 3.2 og 3.3 og internstandardene i tabell 3.4.

Tabell 3.1: Kjemikalier benyttet i oppgaven med CAS-nr., kvalitet og produsent.

Kjemikalie	CAS-nr.	Kvalitet	Produsent/Leve- randør
Acetonitril	75-05-8	LC-MS	Merck/VWR
Metanol	67-56-1	LC-MS	Merck/VWR
Ammoniumformat	540-69-2	≤ 99,995% trace metals basis	Aldrich
Ammoniunhydroksid- løsning	1336-21-6	ACS-reagens 28-30 %	Sigma-Aldrich
MilliQ vann		18 MΩ · cm	
Maursyre	64-18-6	ARISTAR Formic acid 100 %	Prolabo/VWR
Saltsyre	7647-01-0	AnalaR Normapur, 37 %	VWR
2-propanol	67-63-0	LiChrosolv gradient grade for LC	Merck
0-serum		Blod fra blodbanken	St. Olavs hospital

Tabell 3.2: Referansestoffer benyttet i standardløsningene med CAS-nr., renhet og leverandør.

Analytt	Forbindelse	CAS-nr.	Renhet	Leverandør
Amfetamin	Amfetaminsulfat	60-13-9	0,997	Lipomed
Metamfetamin	Metamfetamin-HCl	51-57-0	1,000	Sigma Aldrich
MDA	MDA-HCl	6292-91-7	0,998	Lipomed
MDMA	MDMA-HCl	64057-70-1	0,995	Lipomed
Ritalinsyre	Ritalinsyre-HCl	19395-40-5	0,991	Chiron

3. MATERIALER OG METODER

Tabell 3.3: Referansestoffer benyttet i kontrolløsningene med CAS-nr., renhet og leverandør.

Analytt	Forbindelse	CAS-nr.	Renhet	Leverandør
Amfetamin	Amfetamin-HCl	2706-50-5	0,995	Chiron
Metamfetamin	Metamfetamin-HCl	51-57-0	1,003	NMD
MDA	MDA-HCl	6292-91-7	0,985	Chiron
MDMA	MDMA-HCl	64057-70-1	0,995	Chiron
Ritalinsyre	Ritalinsyre-HCl	19395-40-5	0,980	TRC

Tabell 3.4: Intern-standarder med CAS-nr. og leverandør.

Intern-standard	CAS-nr.	Leverandør
Amfetamin- $^{13}C_6$	1419916-80-5	Chiron
Metamfetamin- $^{13}C_6$	1419916-80-5	Chiron
MDA- $^{13}C_6$	1536075-11-2	Chiron
MDMA- $^{13}C_6$	1536079-50-1	Chiron
Ritalinsyre- d_4	N/A	Cerilliant

3. MATERIALER OG METODER

Utstyr og instrumenter brukt i oppgaven er listet i tabell 3.5.

Tabell 3.5: Instrumenter og utstyr benyttet i oppgaven.

Utstyr/instrument	Produkt	Produsent
Vannrenseanlegg	Elix5 MilliQ-Element	Millipore
Prøverør	tt-rør 14 x 81 mm	HEGER AS
Propp til prøverør	Propp til prøverør 14 mm	HEGER AS
Mikrorør til standarder og kvalitetskontroller	MATRIX ScreenMates Tubes 1,4 ml	Thermo Scientific
Plate-mikser	Co-mix Multi format	Vitl Life Science solution
Filteringsplate	Ostro 96-brønnsplate	Waters Corporation
Inndamper	Ultravap	PorvairSciencec/Teknolab
PPP-modul	Positive Pressure 96-Processor	Waters Corporation
Oppsamlingsplate	2 ml 96-dypbrønnsplate	Waters Corporation
Forseglingsmatte for 2 ml 96-brønnsplate	Cap-mat square plugs, Silicone/PTFE treated, pre slit	Waters Corporation
Forkolonne	VanGuard BEH C18 1,7 μ m 2,1 x 5 mm	Waters Corporation
Kolonne	Acquity UPLC BEH C18 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm	Waters Corporation
Pipetteringsrobot	Hamilton LM Star	Hamilton Robotics AB
LC-MS/MS	Acquity UPLC I-Class	Waters Corporation

3.2 Tillaging av løsninger

Acetonitril med 1 % maursyre

495 ml acetonitril (ACN) ble målt i en 500 ml målesylinder og overført til en 1000 ml glassflaske. 5 ml maursyre (FAc) ble tilsatt ved bruk av Eppendorf multipipette.

10 % metanol i vann

100 ml metanol (MeOH) ble målt i en 100 ml målesylinder og overført til en 1000 ml glassflaske. 900 ml MilliQ-vann ble målt i en 1000 ml målesylinder og tilsatt.

0,3 M saltsyre i metanol

2/3 av en 100 ml målekolbe ble fylt med metanol. 2,50 ml saltsyre (HCl) ble tilsatt med Eppendorf multipipette. Metanol ble fylt opp til 100 ml.

50 mM ammoniumformat

3,15 g ammoniumformat ble løst i 1,0 l Milli-Q-vann i en 1000 ml målekolbe og overført til glassflaske.

5 mM ammoniumformat pH 10,1

200 ml 50 mM ammoniumformat ble målt i en 250 ml målesylinder og overført til 2000 ml målekolbe. Milli-Q-vann ble fylt til merket og blandet 10 ganger mot kork. pH ble justert med ammoniumhydroksidløsning til $10,1 \pm 0,1$, ca 5 ml. Løsningen ble blandet ved å vende 10 ganger mot kork.

Vaskeløsning til LC

460 ml vann, 500 ml metanol, 500 ml acetonitril og 500 ml 2-propanol ble målt i 500 ml målesylinder og overført til 2000 ml glassflaske. 40 ml maursyre ble målt i 50 ml målesylinder og tilsatt og løsningen ble vendt fem ganger.

Standardløsninger i serum

For både standardløsninger, kvalitetskontroller og intern-standarder lages det stamløsninger. Disse består av referansetoffet løst i metanol, bortsett fra amfetamin som er løst i vann. Stammløsningene oppbevares ved 4 °C, med unntak av ritalinsyre som oppbevares ved -20 °C. Fra stamløsningene lages det bruksløsninger med alle analyttene, én bruksløsning for hvert konsentrasjonsnivå. Disse er laget med en konsentrasjon 100 ganger høyere enn standardløsningene, og de er løst i 20 % metanol i vann.

3. MATERIALER OG METODER

Konsentrasjonene i standardløsningene er presentert i tabell 3.6. 10 ml 0-serum ble tilsatt 100 µl bruksløsning for hvert av standardnivåene. 0-serum er serum fritt for analyttene, og det fås fra blodbanken ved St. Olavs hospital. Standardløsningenes konsentrasjoner er jevnt fordelt over analyttenes måleområde.

Tabell 3.6: Konsentrasjoner i serum for analyttene i standardløsningene.

Analytt	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5
	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]
Amfetamin	25,0	75,0	300	1000	2000
Metamfetamin	25,0	75,0	300	1000	2000
MDMA	25,0	75,0	250	500	1000
MDA	25,0	75,0	250	500	1000
Ritalinsyre	200	500	1000	2500	5000

Kvalitetskontroller i serum

Konsentrasjonene av kvalitetskontrollene er presentert i tabell 3.7. 25 ml 0-serum ble tilsatt 250 µl bruksløsning for hvert av konsentrasjonsnivåene.

Tabell 3.7: Konsentrasjon i serum for analyttene i kvalitetskontrollene (QC).

Analytt	LavQC	QC1	QC2	QC3
	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]
Amfetamin	25,0	40,0	200	1500
Metamfetamin	25,0	40,0	200	1500
MDMA	25,0	40,0	150	800
MDA	25,0	40,0	150	800
Ritalinsyre	200	300	750	4000

3. MATERIALER OG METODER

Intern-standardløsning Konsentrasjoner av intern-standarder løst i metanol og vann (20/80) er presentert i tabell 3.8.

Tabell 3.8: Konsentrasjoner av intern-standarder løst i MeOH/vann (20/80).

Forbindelse	Konsentrasjon [ng/ml]	Konsentrasjon [nM]
Amfetamin- $^{13}C_6$	50,0	354
Metamfetamin- $^{13}C_6$	50,0	322
MDMA- $^{13}C_6$	80,0	402
MDA- $^{13}C_6$	100	540
Ritalinsyre- d_4	50,0	224

3.2.1 Pasientprøver

Både positive og negative pasientprøver for analyttene i oppgaven ble analysert. Pasientprøvene var gjenværende prøvemateriale etter tidligere analyserte prøver ved AKF.

3.3 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse med Ostro 96-brønns fosfolipidfjerningsplater ble gjennomført med bruk av Hamilton pipetteringsrobot. Alle løsningene var romtempererte bortsett fra felingsreagenset acetonitril som ble tatt direkte fra fryseren.

100 μ l prøve, 25 μ l intern-standard og 375 μ l iskald ACN m/1 % FAc ble tilsatt Ostro-platen med pipetteringsroboten Hamilton. Prøvene ble blandet ved å trekke løsningen opp i pipettene tre ganger. Ostroplaten ble så plassert oppå en 2 ml dypbrønnsplate og flyttet til en Positive Pressure Processor (PPP)-modul. Trykket ble satt på og økt inntil filtreringsraten var én dråpe per sekund i to minutter (ca 4 psi). Etter to minutter ble trykket økt ytterligere 2 psi i ett minutt. 10 μ l 0,3 M HCl i metanol ble tilsatt filtratene ved hjelp av multipipette. Prøvene ble ristet i 20 sekunder ved 500 rpm. Deretter ble de dampet inn med luft ved 40 °C i 40 minutter ved bruk av UltraVap. 100 μ l 10 % metanol i vann ble tilsatt for å gjenoppløse prøvene ved bruk av multipipette. Dypbrønnsplaten ble forseglet med forseglingsmatte og ristet i 1 minutt ved 2100 rpm. Dypbrønnsplaten ble så satt i autosampler for UHPLC-MS/MS-analyse.

3.4 Analysebetingelser

Analysebetingelsene i UHPLC-MS/MS er gitt i tabell 3.9, og instillingene i ionekilden i tabell 3.10.

Tabell 3.9: Analysebetingelser i UHPLC-MS/MS

UHPLC	Acquity UPLC I-Class
Detektor	Xevo TQ-S
Instrumentsoftware	MassLynx
Gain	0,3
Injeksjonsvolum	2 μ l
Kolonnetemperatur	50 °C
Autosample-temperatur	10 °C
Pre Inject Wash	10 s
Post Inject Wash	15 s
Mobilfase	5 mM NH ₄ -format pH 10,1 Acetonitril

Tabell 3.10: Innstillinger i ionekilden i MS.

Kapillærspenning(kV)	1,0
Ionekildetemperatur(°C)	120
Desolvation temperatur(°C)	650
Cone gas flow(L/h)	150
Desolvation gas flow(L/h)	1000

3.4.1 Gradientprogram

Gradientprogrammet brukt på UHPLC-MS/MS er presentert i tabell 3.11.

Tabell 3.11: Gradientprogram for mobilfase brukt på UHPLC-MS/MS. A representerer 5 mM ammoniumformat med pH 10.1 og B er acetonitril. Kurvetilpasning 6 er en lineær sammenheng.

Tid [min]	Flow [ml/min]	Andel A [%]	Andel B [%]	Kurve
1,0	0,6	95,0	5,0	Initial
2,0	0,6	72,0	28,0	6
2,2	0,6	2,0	98,0	6
3,0	0,6	95,0	5,0	1
3,2	0,6	95,0	5,0	1

MRM-overganger og kvantifiseringsion ble bestemt i min prosjektoppgave[8], i tillegg til optimalisering av conespenning og kollisjonsenergi for ritalinsyre. For de øvrige analyttene ble conespenning og kollisjonsenergi fra S. Hegstad et al.[54] brukt. Verdiene er presentert i tabell 3.12.

3. MATERIALER OG METODER

Tabell 3.12: MRM-overganger, kvantifiseringsion, conespenning, kollisjonsenergi og dwell-tid for analyttene og intern-standardene.

Komponent	MRM-overgang [m/z]	Kvant.ion	Conespenning [V]	Kollisjonsenergi [eV]	Dwell tid [min]	Retensjonstid [min]
Amfetamin	135,9 > 119	x	20	8	0,007	1,45
	135,9 > 91		20	15	0,007	1,45
Amfetamin- ¹³ C ₆	142 > 97		20	15	0,007	1,45
Metamfetamin	150 > 119	x	20	15	0,007	1,58
	150 > 91		20	40	0,007	1,58
Metamfetamin- ¹³ C ₆	156 > 125		20	15	0,007	1,58
MDMA	195 > 133	x	20	20	0,007	1,52
	195 > 105		20	22	0,007	1,52
MDMD- ¹³ C ₆	200 > 139		20	20	0,007	1,52
MDA	180 > 163		20	17	0,007	1,41
	180 > 133	x	20	17	0,007	1,41
MDA- ¹³ C ₆	186 > 139		20	17	0,007	1,41
Ritalinsyre	220 > 174		40	20	0,047	0,92
	220 > 56	x	40	40	0,047	0,92
Ritalinsyre- <i>d</i> ₄	224 > 88		40	20	0,047	0,91

Tilstrekkelig antall datapunkter for de ulike kromatografiske toppene ble innstilt. Ritalinsyre ga den smaleste toppen, og denne hadde omtrent 15 punkter over toppen.

3.5 Databehandling

MassLynx 4,1 Software fra Waters Corporation ble brukt til databehandling. TargetLynx ble brukt til prosessering av kromatogrammene. Prosesseringsparametrene er presentert i tabell 3.13. For amfetamin ble høyde brukt til beregning av konsentrasjonen. For de øvrige analyttene ble areal brukt.

3. MATERIALER OG METODER

Tabell 3.13: Parametre brukt i automatisk prosessering av kromatogrammene med TargetLynx.

Parameter	
Kurvetilpasning	Kvadratisk
Kalibrering i origo	Ekskluder
Vekting	1/X
Glattingsmetode	Gjennomsnitt
Glattingsiterasjoner	2
Glattingsbredde	2

3.6 Prevalidering

Før selve valideringen startet ble det gjennomført prevalideringsforsøk. Utvalgte forsøk fra valideringen med færre paralleller gjennomføres for å undersøke om analysemetoden ligger innenfor gitte krav som sikrer at selve valideringen vil ligge innenfor akseptkriteriene.

Opparbeidelsen ble gjennomført som beskrevet i kapittel 3.3 og UHPLC-MS/MS-analysene i henhold til kapittel 3.4.

Kromatogrammene til høyeste og laveste standard ble undersøkt. Stabilitet i retensjonstid, variasjon i ioneratio, variasjon i intern-standard (19 pasientprøver), nøyaktighet og repeterbarhet i seks paralleller ble undersøkt.

Overdrag ble undersøkt etter høyeste standard og etter en standard med konsentrasjon dobbelt så høy som høyeste standard, kalt HøyStd. En serumprøve uten analytt ble opparbeidet, kalt standard 0. I en analyseserie på UHPLC-MS/MS ble standard 0 injisert før og etter HøyStd og høyeste standard for å undersøke overdrag.

Matrikseffekter ble undersøkt med Matuszewskis metode[49] i serumprøver fra tre ulike personer. Ekstraksjonsutbytte ble undersøkt i tre paralleller av laveste kvalitetskontroll.

3.7 Validering

Validering ble gjennomført i henhold til retningslinjene satt ved AKF, og presentert i valideringsplanen i vedlegg A.3. Akseptkriteriene tar utgangspunkt i retningslinjene gitt i *Food and Drug Administration* veiledning for validering i bioanalyser[45] og laboratorieveiledning fra *Society of Forensic Toxicologists*[55].

I valideringen av metoden ble følgende parametre inkludert: deteksjons- og kvantifiseringsgrense, linearitet, presisjon, nøyaktighet, selektivitet, ekstraksjonsutbytte, overdrag, retensjonstid, ioneratio, robusthet, variasjon i intern-standard, spesifisitet og holdbarhet.

3.7.1 Minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon (MDK og MKK)

Deteksjonsgrensen ble bestemt ved å lage en fortynningsrekke av den laveste standarden. Standard 1 ble fortennet 1:2, 1:5 og 1:10 med 0-serum, og opparbeidet og analysert. Signal-til-støy-forhold ble målt for å bestemme MDK.

Kvantifiseringsgrensen ble satt lik standard 1. En kvalitetskontroll med konsentrasjon lik standard 1 (LavQC) ble analysert sammen med standardløsningene og kvalitetskontrollene over ti dager. Signal-til-støy-forhold ble målt for LavQC. RSD og avvik fra teoretisk verdi ble rapportert for de målte konsentrasjonene.

3.7.2 Linearitet

Tre paralleller på hvert konsentrasjonsnivå (standard 1-5) ble opparbeidet og analysert. Vektete kvadratiske standardkurver ($1/x$) ble plottet med MassLynx. Kurvenes forklaringskoeffisient R^2 ble vurdert.

En standard (HøyStd) med dobbelt så høy konsentrasjon som standard 5 ble analysert for å vurdere kalibreringskurvens videre forløp over måleområdet.

3.7.3 Presisjon

Presisjon ble undersøkt ved repeterbarhet og reproduserbarhet. Repeterbarhet innen serie ble undersøkt ved å analysere ti paralleller på hvert nivå av kvalitetskontrollene (QC1-QC3). Reproduserbarhet mellom serier ble undersøkt ved å analysere kvalitetskontrollene,

med en prøve for hvert konsentrasjonsnivå. Dette ble gjentatt over ti dager, og en av dagene ble opparbeidelsen utført av en annen analytiker.

Resultatene ble rapportert som gjennomsnitt og RSD på hvert konsentrasjonsnivå.

3.7.4 Nøyaktighet

Resultatene fra reproduserbarhetsforsøkene ble brukt for å bestemme nøyaktigheten til metoden. Resultatene ble rapportert som gjennomsnitt og prosentvis avvik fra teoretisk verdi.

I tillegg ble to prøver fra sammenlignende laboratorieprøving (SLP) for ritalinsyre analysert. Fra disse resultatene ble Z-verdier beregnet.

3.7.5 Selektivitet

Standard 0 (0-serum kun tilsatt IS) fra seks forskjellige personer ble opparbeidet og analysert. Kromatogrammene ble undersøkt for interfererende toppe i tidsområdet analyttene er forventet å eluere.

3.7.6 Matrikseffekter

Det ble benyttet Matuszewskis metode[49] for vurdering av eventuelle matrikseffekter. Matrikseffektene ble bestemt ved lavt og høyt konsentrasjonsnivå av kvalitetskontrollene (QC1 og QC3). To negative serumprøver fra seks forskjellige personer ble opparbeidet (totalt 12) uten tilsetning av intern-standard eller analytt. Volumet til intern-standard ble erstattet med 25 µl 20 % metanol i vann. 10 µl 0,3 M saltsyre ble tilsatt og prøvene dampet inn. Én prøve fra hver av personene ble gjenopløst i 100 µl analyttløsning med konsentrasjon lik QC1 i 10 % metanol i vann, og de resterende prøvene ble løst i analyttløsning med konsentrasjon lik QC3.

De to analyttløsningene (QC1 og QC3) ble hver tilsatt tre tomme brønner. Analyttløsningene og prøvene ble så tilsatt 10 µl intern-standard. Deretter ble prøvene analysert ved bruk av UHPLC-MS/MS. Resultatene ble rapportert som prosentvis RSD og matrikseffekt, med og uten korrigering for intern-standard.

3.7.7 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbytte ble bestemt ved to konsentrasjonsnivåer, QC1 og QC3 med seks paralleller på hvert nivå. Tolv paralleller med 0-serum ble opparbeidet uten tilsats av intern-standard. Volumet av intern-standard ble erstattet med 25 µl 20 % metanol i vann. Prøvene ble tilsatt 10 µl 0,3 M HCl og dampet inn. Det samme ble utført for seks paralleller med serumprøver tilsatt analytt ved konsentrasjon QC1 og seks paralleller ved QC3. Prøvene med 0-serum ble gjenoppløst i 100 µl 10 % metanol i vann med analyttkonsentrasjon tilsvarende QC1 og QC3. De andre prøvene ble gjenoppløst i 100 µl 10 % metanol i vann. 10 µl intern-standard ble tilsatt alle prøvene til slutt.

3.7.8 Overdrag

For å undersøke overdrag ble HøyStd opparbeidet og analysert med standard 0 injisert rett før og tre injeksjoner rett etterpå. Det samme ble gjort for standard 5 (høyeste standard).

3.7.9 Robusthet

Robusthet til metoden ble undersøkt ved drift i serie samt ulik konsentrasjon av syre (HCl) tilsatt under opparbeidelse. Drift i en analyseserie ble undersøkt ved å injisere en kvalitetskontroll helt i starten og slutten av analyseserien. Resultatene ble rapportert som prosentvis drift i konsentrasjonen i løpet av serien.

Det tilsettes 0,3 M HCl under opparbeidelsen for å unngå at amfetamin fordamper. Amfetamin er mindre flyktig i sur enn i basisk løsning fordi den foreligger i den ladede protonerte formen. Kvalitetskontrollene (QC1-QC3) ble tilsatt HCl med konsentrasjon 0,20, 0,25 eller 0,40 M. En parallell med kvalitetskontroller ble opparbeidet uten tilsats av syre. Resultatene ble rapportert som avvik fra tilsats av 0,3 M HCl.

3.7.10 Variasjon i intern-standard

Variasjon i intern-standard ble undersøkt ved å analysere standarder, kvalitetskontroller og ti negative pasientprøver. Resultatene ble rapportert som intern-standardenes avvik (areal/høyde) i forhold til gjennomsnitt av areal/høyde til standardene.

3.7.11 Holdbarhet

Holdbarhet av opparbeidede prøver ble undersøkt. Andre holdbarhetsforsøk som er inkludert i avdelingens valideringsplan (vedlegg A.3) ble ikke gjennomført på grunn av tidsperspektivet på denne oppgaven. Disse forsøkene vil bli gjennomført i ettertid, før analysemetoden implementeres i rutinedrift.

Opparbeidede standarder, kvalitetskontroller og pasientprøver ble oppbevart i autosampleren eller på kjølerom (4-10 °C). Prøvene ble analysert ved dag 0, og reinjisert etter tre og fem dager. Resultatene ble oppgitt som endring i konsentrasjon i forhold til dag 0.

3.7.12 Ioneratio

Ioneratio ble undersøkt ved å analysere standarder, kvalitetskontroller og pasientprøver over tre dager. Resultatene ble rapportert som prosentvis avvik fra gjennomsnitt av standard 2 og 3.

3.7.13 Retensjonstid

Stabilitet i retensjonstid ble undersøkt ved å analysere standarder og kvalitetskontroller på tre forskjellige dager. Resultatene ble rapportert som relativ retensjonstids avvik fra referanseprøve (gjennomsnitt av standard 2 og 3).

3.7.14 Spesifisitet

Forbindelser som analyseres ved AKF og har molekylvekt ± 1 g/mol i forhold til analytene i metoden, ble analysert med metoden beskrevet i denne oppgaven. Dette var for å undersøke om andre forbindelser kan gi falske positive resultat. Parametoksymetamfetamin (PMMA) og meprobamat var de eneste forbindelsene i avdelingens analyserepertoar som var aktuelle.

Stamløsninger av PMMA og meprobamat ble fortynnet i 10 % metanol i vann tilsvarende høyeste standard i deres måleområde. Stamløsningene var begge i konsentrasjon 1 mg/ml. 100 μ l stamløsning ble fortynnet med 10 ml 10 % metanol i vann.

Tabell 3.14: Spesifisitetsforsøk. Forbindelser som kan interferere med analyttene med tilhørende molekylvekt.

Analytt	Molekylvekt [g/mol]	Mulig interfererende forbindelse	Molekylvekt [g/mol]
Ritalinsyre	219,28	Meprobamat	218,25
MDA	179,22	PMMA	179,13

3.7.15 Metodesammenligning

Den nye analysemetoden ble sammenlignet med dagens rutinemetoder som brukes ved AKF. Det eksisterer én metode for amfetamin, metamfetamin, MDA og MDMA, og én metode for ritalinsyre.

Seks positive amfetaminprøver ble analysert med den eksisterende og nye metoden samme dag. På grunn av få positive pasientprøver med tilstrekkelig gjenværende prøvevolum til å analysere med begge metodene, ble 16 negative pasientprøver tilsatt bruksløsning med alle analyttene. Disse ble også analysert med begge metodene samme dag.

15 positive ritalinsyreprøver ble analysert med ny og eksisterende metode på samme dag. Resultatene ble rapportert som prosentvis avvik for den nye metoden i forhold til den eksisterende.

3.7.16 Samkjøring mellom instrumenter

Tre analyseserier med standarder, kvalitetskontroller og positive pasientprøver ble analysert med hovedinstrumentet på hver sin dag. Pasientprøvene var de samme som de som ble brukt til metodesammenligning. I tillegg ble det analysert ti positive amfetaminprøver som ikke hadde tilstrekkelig prøvevolum til å brukes ved metodesammenligning. De opparbeidede prøvene ble analysert ved bruk av reserveinstrumentet samme dag som hovedinstrumentet, bortsett på én analyseserie. På grunn av kapasitetsproblemer ble den ene analyseserien analysert den påfølgende dagen med reserveinstrumentet.

4 Resultater og diskusjon

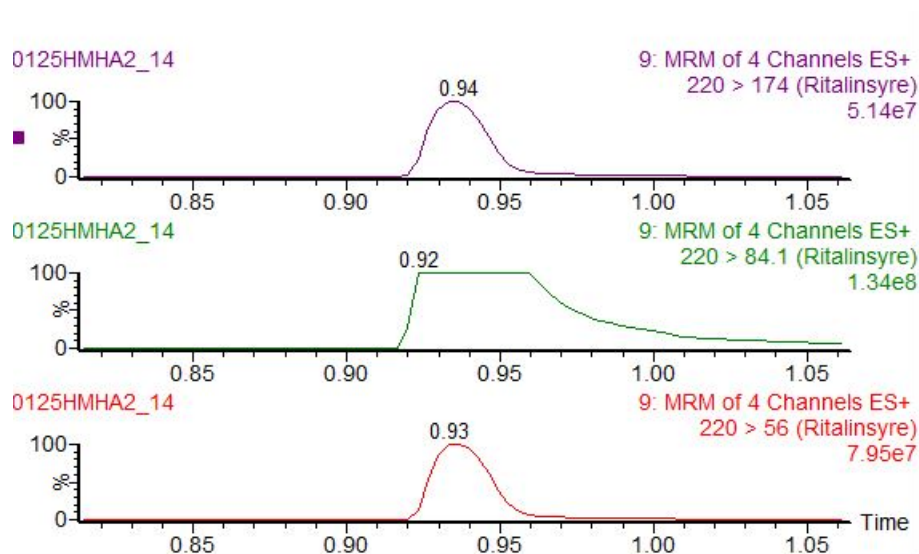
4.1 Metodeutvikling

I min prosjektoppgave *Kvantifisering av amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i serum - bruk av pipetteringsrobot og UHPLC-MS/MS*[8] ble det utviklet en ny kvantitativ analysemetode med bruk av UHPLC-MS/MS for amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA og ritalinsyre. Delvis automatisert prøveopparbeidelse med Hamilton Star pipetteringsrobot ble testet med tre ulike fosfolipidfjerningsplater Ostro (Waters), Phree (Phenomenex) og Isolute PLD+ (Biotage). Bruk av Ostro fosfolipidfjerningsplate ga best resultat med hensyn på utbytte og fjerning av blindtopper. Fremgangsmåten for prøveopparbeidelse som ble valgt er presentert i kapittel 3.3. Ulike typer kolonner og ulike mobilfaser ble testet. Kolonnen BEH C₁₈ med mobilfasegradient bestående av 5 mM ammoniumformat (pH 10,1) og acetonitril ga de beste resultatene med hensyn på separasjon.

4.1.1 Metodeutvikling MS

I min prosjektoppgave[8] ble det for ritalinsyre brukt MRM-overgangene m/z 220>174 (kvalifiseringsion) og m/z 220>56 (kvantifiseringsion). Ved lave masser i MRM-overgangene er det større sannsynlighet for at andre forbindelser fragmenteres til den samme massen. 56 er en lav masse og er derfor mer utsatt for interferenser under deteksjonen av analytten. I andre publiserte artikler brukes m/z 220>84 [56, 57] for ritalinsyre. MRM-overgangen m/z 220>84 ble derfor undersøkt.

Kromatogrammene fra analysene med denne overgangen viste at intensiteten er for sterk i forhold til de andre overgangene i metoden, og det vil si at detektoren blir mett, se figur 4.1. På grunn av dette ble overgangen m/z 220>84 ikke brukt videre.



Figur 4.1: Kromatogram for ritalinsyre med MRM-overgangene m/z 220>174, m/z 220>84 (metning) og m/z 220>56.

Ved overføring av store konsentrasjoner analytt til detektoren, kan massespektrometeret oppleve metning. Dette ses som kromatografiske topper som er kuttet eller flate på toppen, som vist i figur 4.1. For å unngå dette kan parameteren *Gain* justeres[58]. Dette er relatert til forsterkningen av utgangssignalet i detektoren. *Gain* endrer den elektriske strømmen som kommer ut av detektoren som et resultat av ionene som treffer detektoren. Ved å redusere *Gain* vil signalet til de ulike overgangene reduseres, mens signal-til-støy-forholdene forblir uendret.

På grunn av problemer med kvalitetskontroller som avvek for MDMA under metodeutviklingen, ble en annen MRM-overgang for MDMA undersøkt. I andre publiserte artikler [59–61] brukes m/z 194>163 som kvantifiseringsion, mens i denne oppgaves brukes m/z 194>133. Overgangen m/z 194>163 ble lagt til, og tre ulike kollisjonsenergi, 12, 15 og 18 eV, ble testet. Denne overgangen ga også for høy intensitet ved alle de tre undersøkte kollisjonsenergiene, og ble derfor ikke brukt videre i metodeutviklingen.

4.1.2 Metodeutvikling UHPLC-MS/MS

Standarder og kvalitetskontroller ble opparbeidet og analysert som beskrevet i kapittel 3.3.

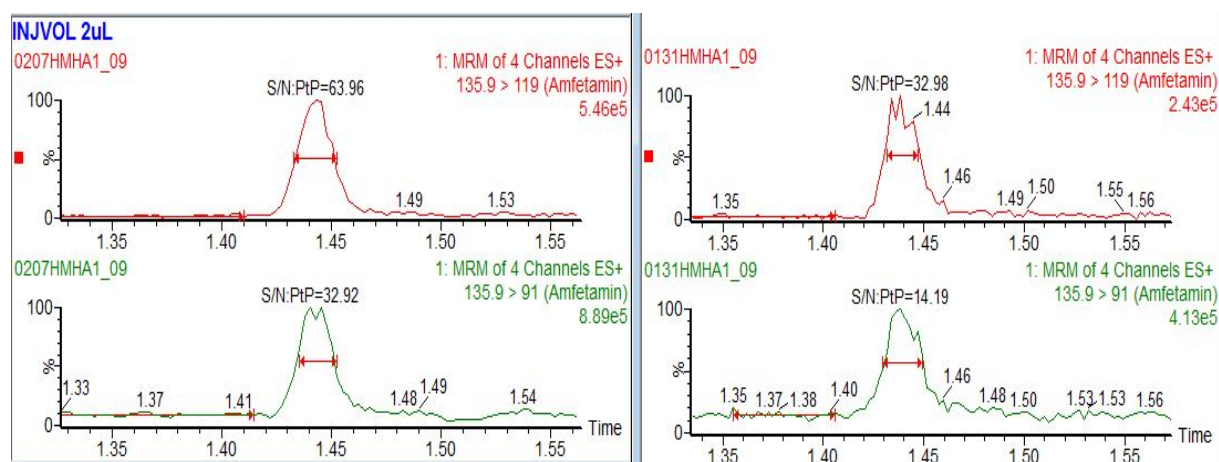
Rutineanalyser ved AKF skal ha to godkjente instrumenter for hver analysemetode for at analysene skal kunne gå som normalt, selv om det ene instrumentet ikke er operativt. Et

4. RESULTATER OG DISKUSJON

av instrumentene skal fungere som hovedinstrument, mens det andre er reserveinstrument. Under metodeutviklingen ble utvalgte prøveserier analysert på begge instrumentene for å undersøke om metoden fungerte godt på begge.

Standarder og kvalitetskontroller som ble injisert på både hoved- og reserveinstrumentet, viste at instrumentene ga ulike resultat. Generelt ble topparealene lavere med reserveinstrumentet enn hovedinstrumentet. Arealet til laveste standard for amfetamin var i utgangspunktet lavt. Siden dette arealet ble enda lavere under analyser med reserveinstrumentet, måtte metoden endres for å tilfredsstille kravene til signal-til-støy-forhold. Godkjenningsskriteriene ved AKF for S/N i laveste standard er 30 for kvantifiseringsionet og 10 for kvalifiseringsionet. S/N for amfetamin lå akkurat over dette med injeksjonsvolum lik 1 µl. Dette ga et for dårlig utgangspunkt for å starte validering, ettersom erfaring viser at variasjoner i instrumentet over tid kan gi lavere signaler.

Injeksjonsvolumet ble forsøkt økt fra 1 µl til 2 og 3 µl. Ved 3 µl gikk signalet til MDMA og MDA i metning ved bruk av hovedinstrument. Ved 2 µl var signalet til amfetamin innenfor kriteriene for signal-til-støy-forhold (figur 4.2), og MDMA og MDA gikk ikke i metning. På bakgrunn av dette ble 2 µl valgt som injeksjonsvolum.



Figur 4.2: Kromatogram for MRM-overgangene til amfetamin med signal-til-støy-forhold. Til venstre er injeksjonsvolumet 2 µl og til høyre 1 µl.

4.1.3 Kalibreringskurver

Kvadratiske kurvetilpasninger ble valgt for alle analyttene. Dersom detektoren mettes på grunn av høy signalintensitet, vil kalibreringskurven bøye av. Under metodeutvikling i

prosjektoppgaven [8] var kurvene bøyde for MDMA og MDA. På grunn av dette ble konsentrasjonen i høyeste standard senket fra 2000 til 1000 nM. En kvadratisk kurvetilpasning vil tilpasse seg metning bedre enn en lineær kurve. Under rutinedrift vil variasjoner i instrumentet forekomme slik at detektoren kan bli mettet. Ut i fra disse erfaringene vil kvadratisk kurvetilpasning bli benyttet. Ekskludering av origo i kalibreringskurven gjøres for at eventuell bakgrunn i matriks uten analytt ikke skal påvirke kurvene. Kurvene er også vektet $1/x$ for å unngå at standarder med høye konsentrasjoner får for stor vektning i kurven.

4.1.4 Kvalitetskontroller

Kvalitetskontrollene ble opparbeidet og analysert under metodeutviklingen. Resultatene viste at konsentrasjonen i kvalitetskontrollene for MDMA avvek med opptil +15 % i forhold til teoretisk verdi. Under validering er det anbefalte akseptkriteriet for nøyaktighet at absoluttverdien skal være < 15 %. Nye undersøkelser ble gjort for å forsøke og finne mulige årsaker til avvikene. Det ble laget nye bruksløsninger for å sjekke om avvikene skyldtes feil i tillagingen av løsninger. Dette ga ikke bedre resultater. Et annet gradientprogram publisert av Hegstad et al.[54] med 0,1 % maursyre i vann og metanol ble deretter testet. Kvalitetskontrollene avvek fortsatt med opptil +14 % for MDMA.

Analyser med andre intern-standarder ble også gjennomført for å undersøke om dette påvirket avvikene. De ^{13}C -merkede intern-standardene ble byttet ut med deutererte intern-standarder (amfetamin- d_3 , metamfetamin- d_5 , MDMA- d_5 , MDA- d_5 og ritalinsyre- d_9). Dette ga avvik fra teoretisk verdi opp til 12 %. Standarder fra rutinen ble også analysert. Avvikene til kvalitetskontrollene var fortsatt opp til 11 %.

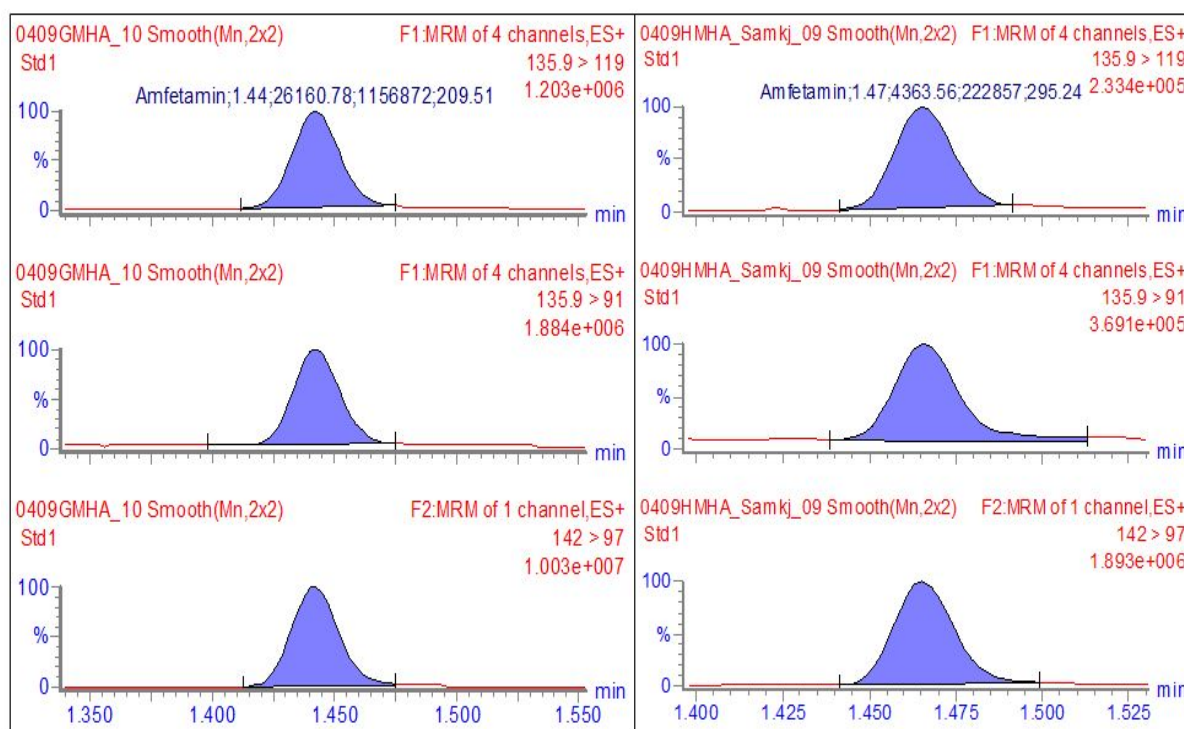
Årsaken til avvikene i kvalitetskontrollene til MDMA ble ikke identifisert. Under valideringen ble det fulgt nøye med på om MDMA lå innenfor de anbefalte kriteriene.

4.1.5 Prosessering av kromatogrammene

Under metodeutviklingen ble det nødvendig å endre metoden kromatogrammene ble prosessert med, på grunn av variasjon i integreringen. Særlig integreringen av amfetamin varierte. Den største variasjonen ble observert mellom kromatogrammene fra de to ulike instrumentene. Dette skyldtes at signalet til laveste standard var lavt og at toppen ikke alltid var Gauss-formet. I noen serier hadde toppene haledannelse, og det var ulikt hvor

4. RESULTATER OG DISKUSJON

stor del av halen som ble integrert ved bruk av den automatiske integreringen i Target-Lynx. Et eksempel på variasjon i integreringen av kromatogrammer er vist i figur 4.3. For kvalifiseringsionet er variasjonen tydelig.



Figur 4.3: Prosessert kromatogram for kvantifiseringsion (øverst), kvalifiseringsion (midten) og intern-standard (nederst). Laveste standard for amfetamin analysert og injisert på hovedinstrumentet (til venstre) og reserveinstrumentet (til høyre).

Denne variasjonen vil kunne bidra til unøyaktighet og lavere presisjon i resultatene. Under valideringen var nøyaktigheten og presisjonen over ti dager for laveste standard omtrent lik ved kvantifisering med høyde og areal for amfetamin. Ved bruk av metoden i rutinesammenheng vil hvor mange prøver som tidligere er injisert på kolonnen variere og dette vil kunne gi ulik haledannelsen på toppene. McCoy et al. [41, 42] har vist at høyde gir mer nøyaktig kvantifisering for topper med grunnlinjeforstyrrelser og haledannelse. For å ta hensyn til variasjonene som kan oppstå under rutinedrift, vil høyde bli benyttet til kvantifisering av amfetamin. For de øvrige analyttene vil areal benyttes.

4.2 Prevalidering

Undersøkelse av kromatogrammene til laveste standard viste at signal-til-støy-forhold var innenfor akseptkriteriene ved AKF. Kromatogrammene til høyeste standard ikke gikk i metning. Avvikene i retensjonstid og ioneratio var også innenfor de anbefalte kravene. Nøyaktighet og repeterbarhet var også innenfor kriteriene på henholdsvis 15 % og 10 %.

Analyse av negative pasientprøver viste at generelt var variasjonen i intern-standard tilfredsstillende (<20 % avvik). En av prøvene viste derimot et avvik lik -60 % for amfetamin. Prøvene ble reinjisert på reserveinstrumentet, og avviket var -9 %. I tillegg til denne prøven med avvikende intern-standard-signal, ble ytterlige to prøver tilsatt analyttløsning, opparbeidet og analysert på nytt. Resultatene fra de beregnede konsentrasjonene viste at nøyaktigheten var like god for prøven med stort avvik i intern-standard som de andre prøvene. Dette tyder på at intern-standard evner å korrigere for variasjoner i prøvene som trolig skyldes matrikseffekter.

Metamfetamin og MDMA viste tegn til overdrag etter analyser av en standard med dobbelt så høy konsentrasjon som høyeste kalibreringsstandard (HøyStd). Overdraget beregnet med areal var 21 % for metamfetamin og 14 % for MDMA av arealet til laveste standard. Kravet er at det skal være < 20 % under validering. Etter injeksjon av høyeste standard (standard 5) ble overdraget beregnet til å være 11 % for metamfetamin og 7 % for MDMA.

Under prevalidering lå matrikseffektene med korrigerings med intern-standard mellom 96-107 %, for alle analyttene. Dette er innenfor det anbefalte kriteriet på 75-125 %. RSD var < 4 % for alle analyttene. Ekstraksjonsutbyttet lå mellom 88-94 % med RSD < 5 % for alle analyttene. Det anbefalte kriteriet er > 70 %, og dette er oppfylt.

Alle de undersøkte parametrene i prevalideringen tilfredsstilte valideringskravene, bortsett overdrag for metamfetamin. På grunn av det observerte overdraget for metamfetamin ble standard 0 alltid injisert etter høyeste standard i analyseseriene under validering.

4.3 Validering

Valideringen består av 13 valideringsdager, utført over en periode på sju uker. I løpet av valideringen ble intensiteten til signalet til MDMA for høy, og detektoren gikk i metning. Detektorresponsen ble derfor endret ved *Gain* fra 0,5 til 0,3 på begge instrumentene etter den tredje valideringsdagen.

4.3.1 Minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon

Den laveste standarden ble definert til å være minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK). RSD og avvik i nøyaktighet i analyser av ti serier med MKK er presentert i tabell 4.1. I tillegg er de laveste signal-til-støy-forholdene i de ti seriene for kvantifiseringsionene og kvalifiseringsionene presentert.

Tabell 4.1: MKK er lik laveste standard. Gjennomsnitt, RSD, nøyaktighet og minste signal-til-støy-forhold for kvantifiserings- og kvalifiseringsionene over ti dager er oppgitt.

Analytt	Teor. verdi (MKK) [nM]	Gj.snitt målt verdi [nM]	RSD [%]	Nøyak- tighet [%]	S/N kvant.ion	S/N kval.ion
Amfetamin	25,0	24,5	5,5	-2,0	70	36
Metamf.	25,0	25,9	3,1	3,6	108	48
MDA	25,0	26,8	1,7	7,3	93	81
MDMA	25,0	27,5	3,6	9,8	224	110
Ritalinsyre	200	190	1,9	-5,2	2687	38

Resultatene tyder på at konsentrasjonen varierer lite for den laveste standarden (MKK) ved analyser over forskjellige dager. For alle analyttene er RSD < 6 %, og kravet er < 20 %. Resultatene viser også at nøyaktigheten er innenfor kriteriet på < 20 %. Ingen av analyttene har signal-til-støy-forhold < 36. MKK kan derfor bestemmes til å være 25 nM for amfetamin, metamfetamin, MDA og MDMA, og 200 nM for ritalinsyre.

MKK ble fortynnet til tre konsentrasjonsnivåer (1:2, 1:5, 1:10) for å bestemme minste detekterbare konsentrasjon (MDK). Ved fortynning 1:10 er alle signal-til-støy-forholdene over 3. Det vil si at MDK er 2,5 nM for amfetamin, metamfetamin, MDA og MDMA, og 20 nM for ritalinsyre. Forsøket ble kun gjennomført én gang, og gir derfor bare et øyeblikksbilde

for MDK. Lavere konsentrasjoner ble ikke undersøkt, fordi MDK ut ifra metodens bruksområder er tilstrekkelig. MDMA ga signal-til-støy-forhold lik 57 for kvantifiseringsionet og 59 for kvantifiseringsionet ved fortynning 1:10. MDMA kunne derfor vært fortynnet mer, og fortsatt fått signal-til-støy-forhold over 3. Forsøket viser at MDK for de ulike analyttene ligger i størrelsesorden ti ganger lavere enn verdien for MKK som ble valgt.

4.3.2 Linearitet

Forklaringskoeffisienten R^2 beskriver hvor godt kurvetilpasningen passer til målingene. Resultatene er presentert i tabell 4.2. Det anbefalte akseptkriteriet for kvadratiske kurver er at R^2 skal være $> 0,995$. Dette er oppfylt for alle analyttene. For grafisk fremstilling av kalibreringskurvene, se vedlegg A.1.

Tabell 4.2: Måleområde for analyttene. R^2 -verdier for kalibreringskurvene innen måleområdet samt $R_{HøyStd}^2$ for kurver med et ekstra konsentrasjonsnivå med dobbel konsentrasjon av høyeste standardnivå i måleområdet inkludert. Andregradskurver med vekting $1/x$ og origo ekskludert. N er antall paralleller på hvert konsentrasjonsnivå.

Analytt	Måleområde [nM]	R^2 (N=3)	$R_{HøyStd}^2$ (N=1)
Amfetamin	25-2000	0,9996	0,9993
Metamfetamin	25-2000	0,9997	0,9998
MDA	25-1000	0,9996	0,9994
MDMA	25-1000	0,9997	0,9989
Ritalinsyre	200-5000	0,9991	0,9987

En standard (HøyStd) med konsentrasjon dobbelt så høy som høyeste standard i måleområdet (standard 5) ble analysert. $R_{HøyStd}^2$ er presentert i tabell 4.2 og kurvene er vist i vedlegg A.2. Disse kurvene er også innenfor kriteriet på 0,995. Dette betyr at kurvene følger den kvadratiske kurvetilpasningen også for prøver med konsentrasjon høyere enn måleområdet.

Kurven til MDMA med HøyStd inkludert bøyer litt av i det øvre konsentrasjonsområdet. For kvadratisk kurvetilpasning er R^2 -verdien 0,9989 og oppfylder dermed kriteriet. En lineær kurvetilpasning vil derimot gi R-verdi lik 0,9945, som er utenfor kriteriet. Grunnen til at kurven krummer er at detektorresponsen blir mett ved høye konsentrasjoner av MDMA. Dette var årsaken til at høyeste standard for MDMA og MDA ble senket fra 2000

nM til 1000 nM under metodeutviklingen i min prosjektoppgave[8]. Høye R^2 -verdier kan oppnås selv om kurvene er bøyd når kvadratisk kurvetilpasning blir benyttet. Det er derfor nødvendig å undersøke både kromatogrammer og kurver visuelt, i tillegg til å vurdere R^2 -verdiene.

4.3.3 Repeterbarhet

Analyttenes relative standardavvik for tre nivåer av kvalitetskontroller med ti paralleller i samme serie er presentert i tabell 4.3. RSD-verdiene er $< 2,5\%$, og er godt innenfor det anbefalte kravet på 10% . Dette viser at det er liten spredning i resultatene innen en serie og at repeterbarheten er god.

Tabell 4.3: Repeterbarhet presentert med målt verdi av ti paralleller for alle kvalitetskontrollene i samme serie med tilhørende RSD.

Analytt	Teoretisk konsentrasjon [nM]	Gj.snitt målt konsentrasjon [nM]	RSD [%]
Amfetamin	40,0	39,6	1,3
	200	186	1,3
	1500	1436	1,5
Metamf.	40,0	41,8	1,9
	200	201	0,6
	1500	1522	0,9
MDA	40,0	41,9	2,4
	150	155	1,4
	800	818	1,3
MDMA	40,0	44,5	0,9
	150	163	1,0
	800	872	1,0
Ritalinsyre	300	300	1,2
	750	743	0,9
	4000	3707	1,3

4.3.4 Reproduserbarhet og nøyaktighet

Ti paralleller av kvalitetskontrollene ble analysert ved ti forskjellige dager. Resultatene er presentert i tabell 4.4. RSD er et mål på reproduserbarheten til målingene. RSD er $< 4\%$ for alle analyttene ved alle konsentrasjonsnivå. Dette er godt innenfor akseptkriteriet ($\leq 15\%$).

Nøyaktigheten er oppgitt som den målte konsentrasjonens prosentvise avvik fra teoretisk verdi. Det er anbefalt at absoluttverdien til avviket er $< 15\%$, og dette er oppfylt for alle analyttene, se tabell 4.4. Under metodeutviklingen hadde kvalitetskontrollene til MDMA avvik opp til 15% . Resultatene fra valideringen viser at den gjennomsnittlige nøyaktigheten over ti dager for MDMA har et avvik tilnærmet lik 10% . Det største avviket i løpet av ti analysedager var på 14% . Dette er innenfor akseptkriteriet. Beregnet absoluttverdi for nøyaktighet for de andre analyttene er $< 6\%$, det vil si godt innenfor kriteriet på 15% .

Tabell 4.4: Reproduserbarhet med RSD og nøyaktighet for ti serier analysert ved ti ulike dager.

Analytt	Teoretisk konsentrasjon [nM]	Gj.snitt målt konsentrasjon [nM]	RSD [%]	Nøyaktighet [%]
Amfet-amin	40,0	38,4	1,6	-4,1
	200	189	1,7	-5,7
	1500	1430	2,6	-4,7
Metamf.	40,0	40,8	2,3	1,9
	200	203	2,0	1,4
	1500	1517	1,9	1,1
MDA	40,0	41,8	3,1	4,5
	150	154	1,7	2,9
	800	834	2,5	4,3
MDMA	40,0	43,1	1,2	7,7
	150	165	2,1	9,8
	800	876	2,5	9,5
Ritalin-syre	300	291	2,6	-2,9
	750	753	2,4	0,4
	4000	3780	1,9	-5,5

4. RESULTATER OG DISKUSJON

Z-verdiene for to konsentrasjonsnivåer av sammenlignende laboratorieprøver med ritalinsyre er presentert i tabell 4.5. Z-verdier ble beregnet med ligning 2.8.

Tabell 4.5: Sammenlignende laboratorieprøving (SLP) for ritalinsyre fra LGC. To prøver med ulik konsentrasjon (A og B) analysert på to ulike dager (1 og 2). SDPA er standardavviket beregnet fra alle deltakerne.

	Teoretisk verdi [nM]	Målt verdi [nM]	Snittverdi alle deltakere [nM]	SDPA	Z-verdi
Prøve A1	1043	1151	1149	69,7	0,0
Prøve A2	1043	1242	1149	69,7	1,3
Prøve B1	2022	1896	1898	14,9	-0,1
Prøve B2	2022	2004	1898	14,9	7,1

De beregnede Z-verdiene bør være mindre enn 2. Prøve B1 og B2 er fra samme prøve, men opparbeidet og analysert på to forskjellige dager. Analyse av prøve B1 gir Z-verdi lik -0,1, mens prøve B2 får en Z-verdi lik 7,1. Dette er langt utenfor tiltakskriteriet på 3. Gjennomsnittsverdien for alle deltakerne og standardavviket fra alle deltakerne (SDPA) for prøve B er beregnet kun ut i fra to målinger fra to ulike laboratorier. Etttersom akkurat disse to målingene ligger svært nær hverandre blir SDPA svært liten. Dette påvirker utregningen av Z-verdiene for denne metoden. To målinger gir et altfor lite grunnlag for å kalkulere et pålitelig gjennomsnitt av alle deltakerne og tilhørende SDPA. Den relative verdien av SDPA for andre legemidler og rusmidler som inngår i SLP-program ved AKF ligger generelt i området 7-13 % av den teoretiske verdien. For prøve B er denne verdien < 1 %.

Den målte verdien av prøve B2 ligger nærmere den teoretiske verdien enn den gjennomsnittlige verdien fra alle deltakerne. Den høye Z-verdien skyldes derfor ikke at den målte verdien for B-prøven ligger langt unna gjennomsnittsverdien, men at standardavviket er lavt. For A-prøvene er verdiene basert på kun tre målinger. Det trengs flere deltakere i SLP-analysene for å beregne en pålitelig gjennomsnittsverdi for alle deltakerne med mindre usikkerhet. Derfor kan det ikke dras noen konklusjon om metodens nøyaktighet ut i fra de beregnede Z-verdiene.

4.3.5 Selektivitet

Serum fra seks ulike personer uten tilsatt analyttløsning ble analysert for å undersøke interfererende toppe i kromatogrammene. For overgangen m/z 220>56 til ritalinsyre ble en topp observert i alle prøvene ved forventet retensjonstid til analytten. Arealet av disse toppene var $< 1\%$ av arealet til laveste standard og vil derfor ikke ha noen innvirkning på resultatene. For de øvrige analyttene ble ingen interfererende toppe observert.

4.3.6 Matrikseffekter

Matrikseffekter ble undersøkt for laveste og høyeste kvalitetskontroll. Matrikseffekt for alle fem analyttene og matrikseffekter korrigert med intern-standarder samt deres tilhørende relative standardavvik er presentert i tabell 4.6.

Tabell 4.6: Matrikseffekter (ME) undersøkt for lav og høy kvalitetskontroll med Matuzewskis metode, med og uten korrigering med intern-standard. Relativt standardavvik til ME i prosent.

Analytt	Teoretisk verdi [nM]	ME [%]	RSD [%]	ME _{IS} [%]	RSD _{IS} [%]
Amfetamin	40	76	6,4	99	15,0
	1500	81	3,7	98	2,0
Metamfetamin	40	83	3,9	97	13,3
	1500	83	3,1	101	0,8
MDA	40	61	11,3	90	14,5
	800	72	4,3	98	1,3
MDMA	40	81	4,4	94	13,6
	800	89	1,7	108	2,1
Ritalinsyre	300	73	9,8	90	11,7
	4000	84	2,0	101	1,9

Matrikseffektene ligger mellom 61-89 % uten korrigering med intern-standard. For de intern-standard-korrigerede verdiene ligger matrikseffektene mellom 90-108 %. Dette er innenfor det anbefalte kriteriet for intern-standard-korrigert matrikseffekt lik 75-125 % og

RSD \leq 15 %. Uten korrigerings med intern-standard, ligger resultatene utenfor akseptkriteriene. Resultatene viser at ved bruk av enkel opparbeidelse med felling og fosfolipidsfjerningsplater korrigerer intern-standardene for matrikseffekter.

Fernández et al.[25] har også vist at ved bruk av LLE og LC-MS/MS er det tilnærmet ingen matrikseffekter for amfetaminene med deutererte intern-standarder. Matriksen undersøkt i denne artikkelen var plasma.

De relative standardavvikene for den lave kvalitetskontrollen øker ved korrigerings med intern-standard for alle analyttene. Korrigerings med intern-standard skal generelt redusere standardavviket ved å ta høyde for variasjoner i prøvene, slik det ses for den høye kvalitetskontrollen. Arealet til intern-standardene for én av parallellene ligger omtrent 40 % høyere enn de andre parallellene. Under forsøkene med matrikseffekter ble intern-standardene tilsett manuelt. Unøyaktighet i utførelsen av dette er den mest sannsynlige årsaken til avviket. Denne uteliggeren gjør at RSD blir høyere for intern-standard-korrigerede matrikseffekter. Tas denne ut i fra beregningene blir RSD mindre enn 6 % for alle analyttene.

Matrikseffekter kan ikke fjernes fullstendig ved prøveoppbeidelse og analyse, men ulike strategier kan forsøkes for å minimalisere og kompensere for matrikseffekter. Det er derfor en viktig faktor å undersøke under validering. Under metodeutvikling kan de kromatografiske parametrene endres slik at matrikskomponentene i størst mulig grad ikke eluerer ved samme retensjonstid som analyttene. I tillegg vil bruk av isotopmerkede intern-standarder kunne korrigerer for eventuelle matrikseffekter[39]. Gode intern-standarder vil bli påvirket i samme grad av matrikskomponentene som analyttene. Forholdet mellom analytt og intern-standard vil derfor påvirkes minimalt, og kvantifisering av analyttene vil ikke forstyrres av eventuelle matrikseffekter.

I følge R. Dams et al.[62] studie av matrikseffekter i bioanalyser med LC-MS/MS vil både ioniseringsmetode, prøveoppbeidelse og den biologiske matriksen påvirke matrikseffekten. Bruk av ESI som ioniseringsteknikk er mer utsatt for matrikseffekt enn APCI. Dette skyldes at de er basert på forskjellige prinsipp, hvor APCI er basert på gassfasereaksjoner, men ESI er basert på væskefasereaksjoner.

R. Dams et al.[62] og R. Bonfiglio[63] har også vist at prøveoppbeidelsen innvirker på matrikseffektene. Kun proteinfelling med acetonitril medfører at mange makromolekyler forbli i prøven, og dette bidrar til økt matrikseffekt. Prøveoppbeidelse med SPE gir renere prøver, og dermed mindre matrikseffekter. Eventuelle oppkonsentreringssteg i SPE gjør konsentrasjonen av matrikskomponenter høyere, som igjen fører til mer matrikseffekter.

Store injeksjonsvolum vil tilføre en større mengde matrikskomponenter til instrumentet. Dette kan også øke graden av matrikseffekter.

4.3.7 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet ved ligning 2.6, og verdiene er presentert i tabell 4.7. Areal ble benyttet i beregningene, bortsett fra for amfetamin hvor høyde ble benyttet. Alle analyttene innfrir det anbefalte akseptkriteriet på minimum 70 % ekstraksjonsutbytte. De relative standardavvikene er < 4 %.

Tabell 4.7: Ekstraksjonsutbytte for laveste og høyeste kvalitetskontroll med seks paralleller på hvert nivå. RSD representerer variasjonen i prøvene som er tilsatt analytt før ekstraksjon.

Analytt	Teoretisk verdi [nM]	Utbytte [%]	RSD [%]
Amfetamin	40	79	1,8
	1500	81	3,7
Metamfetamin	40	77	3,4
	1500	79	2,2
MDA	40	85	3,2
	800	85	1,9
MDMA	40	83	2,8
	800	88	1,2
Ritalinsyre	300	79	3,2
	4000	81	1,5

4.3.8 Overdrag

Resultatene fra prevalideringen viste overdrag for metamfetamin og MDMA ved analyse av en standard (HøyStd) med dobbelt så høy konsentrasjon som høyeste standard. Analysene under valideringen viser også overdrag for disse to analyttene. Overdrag for intensitet etter HøyStd og høyeste standard i prosent i forhold til laveste standard er presentert i tabell 4.8.

Tabell 4.8: Prosentvis overdrag i forhold til laveste standard. Areal er brukt til beregningene, bortsett fra for amfetamin hvor høyde er benyttet.

Analytt	Overdrag HøyStd [%]	Overdrag Std 5 [%]
Amfetamin	6	-
Metamfetamin	20	11
MDA	4	-
MDMA	11	9
Ritalinsyre	0,4	-

Det anbefalte akseptkriteriet for overdrag er at intensiteten i standard 0 skal være $< 20\%$ av laveste standard. Ved analyse av HøyStd er overdraget for metamfetamin lik 20% av laveste standard. I rutineanalyser vil det derfor være nødvendig å reinjisere prøver som er injisert rett etter prøver med høyere konsentrasjon av metamfetamin enn måleområdet. I tillegg bør det i en analyseserie injiseres standard 0 rett etter høyeste standard.

For metamfetaminprøver med konsentrasjon innenfor måleområdet er overdraget mindre enn 20% , og reinjisering anses ikke som nødvendig. For MDMA er overdraget etter analyse av HøyStd $< 20\%$ av laveste standard. De øvrige analyttene viser ingen tegn til overdrag.

4.3.9 Robusthet - tilsats av syre under opparbeidelse

Tidligere erfaring med opparbeidelse og analyse av amfetamin ved AKF tilsier at tilsats av syre er nødvendig for at amfetamin ikke skal fordampe under inndamping. Også Wohlfarth et al.[64], Mortier et al.[65], Fernáendes et al.[25] og Concheiro et al.[66] tilsetter syre for å hindre fordamping av amfetamin. En mulig forklaring på hvorfor dette er nødvendig er at amfetamin er mindre flyktig i sin ladede form som oppnås ved lav pH enn sin uladede form ved høy pH.

Resultatene fra dette forsøket viser derimot at tilsatsen av syre har liten innvirkning på fordampingen av amfetamin. I denne metoden tilsettes $10\ \mu\text{l}$ $0,30\ \text{M}$ HCl til $100\ \mu\text{l}$ prøve, $25\ \mu\text{l}$ intern-standard og $375\ \mu\text{l}$ fellingsreagens før inndamping. Avvikene for konsentrasjon av amfetamin ved tilsats av HCl med ulike konsentrasjoner i forhold til $0,3\ \text{M}$ er presentert i tabell 4.9. Avvikene er $< 7\%$ for alle konsentrasjonsnivåene. Resultatene er de samme for kvalitetskontrollene uten tilsats av syre. Dette tyder på at amfetamin ikke fordamper

under opparbeidelsen selv om HCl ikke tilsettes. Tilsatsen av 0,20-0,40 M HCl påvirker heller ikke resultatene til de andre analyttene.

Tabell 4.9: Amfetaminkonsentrasjons prosentvise avvik i forhold til tilsats av 0,3 M HCl med tilsats av HCl ved ulike konsentrasjoner, samt opparbeidelse uten tilsats av saltsyre. Én parallell med kvalitetskontroller ble opparbeidet for hvert konsentrasjonsnivå av HCl.

Kvalitetskontroll	0,20 M HCl [%]	0,25 M HCl [%]	0,40 M HCl [%]	Uten HCl [%]
QC1	5,5	0,8	2,6	7,6
QC2	-1,4	-0,7	-0,9	2,6
QC3	6,2	2,7	4,5	3,7

Fellingsreagenset som benyttes i denne prosedyren er acetonitril med 1 % maursyre. Det vil si at løsningen allerede er litt sur før tilsetningen av syre. Dette kan være tilstrekkelig for at amfetamin ikke fordampes. I andre artikler [25, 64–66] hvor det benyttes syre for å unngå fordamping av amfetamin er analyttene løst i andre løsemidler enn i denne oppgaven. De benytter DCM/isopropanol/25 % ammoniakk eller dietyleter. I eksisterende metode ved AKF benyttes DCM/2-propanol (90+10). Valg av løsemiddel kan være en medvirkende årsak til at det må tilsettes syre for å unngå fordamping av amfetamin.

4.3.10 Robusthet - drift i en analyseserie

En annen robusthetsparameter som ble testet var drift i løpet av en analyseserie. Resultatene viste at konsentrasjonen for kvalitetskontrollen (QC2) injisert ved starten og slutten av analyseserien ikke endret seg mer enn 4 %. Heller ikke arealet for QC2 endret seg mer enn 6 % i løpet av serien. Dette gjaldt for alle analyttene. Dette er innenfor normal variasjon i repeterbarhet, og resultatene tyder derfor på at drift i instrumentet i løpet av en serie ikke påvirker resultatene.

4.3.11 Variasjon i intern-standard

Variasjon i intern-standard ble undersøkt i tre analyseserier med standarder, kvalitetskontroller og ti negative pasientprøver i hver serie. Areal (høyde for amfetamin) for alle intern-standardene reduseres med økende konsentrasjon av analytten. Det største avviket

4. RESULTATER OG DISKUSJON

for hver analytt er presentert i tabell 4.10. Avvikene er beregnet i forhold til gjennomsnittlig respons av intern-standardene i de fem standardene.

Tabell 4.10: Største avvik for areal (høyde for amfetamin) for intern-standard i forhold til gjennomsnitt av intern-standard-areal i de fem standardene i tre analyseserier med standarder, kvalitetskontroller og ti negative pasientprøver.

Analytt	Største avvik [%]
Amfetamin	-51
Metamfetamin	44
MDA	26
MDMA	20
Ritalinsyre	42

4.3.12 Holdbarhet i opparbeidede kvalitetskontroller

På grunn av tidsperspektivet for denne oppgaven ble ikke alle holdbarhetsforsøk som er listet i valideringsplanen (vedlegg A.3) gjennomført. Resultatene fra reinjisering av opparbeidede prøver oppbevart ved 4-10 °C etter tre og fem dager er presentert i tabell 4.11.

Tabell 4.11: Holdbarhet for opparbeidede kvalitetskontroller ved 4-10 °C. Reinjisert etter tre og fem dager.

Analytt	Målt kons. dag 0 [nM]	Målt kons. dag 3 [nM]	Endring ift dag 0 [%]	Målt kons. dag 5 [nM]	Endring ift dag 0 [%]
Amfetamin	37,8	38,5	1,9	38,6	2,1
	1438	1462	1,7	1455	1,2
Metamf.	40,2	40,6	1,0	40,3	0,2
	1537	1514	-1,5	1523	-0,9
MDA	40,3	39,6	-1,7	40,7	1,0
	821	819	-0,3	827	0,8
MDMA	43,4	41,8	-3,7	43,0	-0,9
	869	901	3,6	914	5,1
Ritalinsyre	29903	289	-3,4	285	-4,8
	3794	3817	0,6	3840	1,2

For kvalitetskontroller er kravet at endring i konsentrasjon ved dag 3 og dag 5 skal være < 15 %. Dette er oppfylt for alle analyttene, og dette viser at holdbarheten i opparbeidede prøver er tilstrekkelig god over fem dager.

Ulike faktorer påvirker holdbarheten til prøvene. Når de opparbeidede prøvene blir stående, kan løsemiddelet fordampe. Dette gjør konsentrasjonen av analyttene i prøven høyere. Samme oppkonsentrering skjer med intern-standarder, og forholdet blir derfor påvirket i liten grad. Analyttene kan dekomponere når de blir stående. Hvis intern-standarden ikke dekomponeres i samme grad som analytten vil dette føre til lavere konsentrasjon i kvantifisering av analytten.

Fernandes et al. [25] har også undersøkt holdbarheten til amfetaminene i opparbeidede prøver etter tre dager. Deres prøver er også løst i metanol og vann. De observerer ingen endring i konsentrasjon etter tre dager ved 4-8 °C. Sergi et al. [27] har gjennomført mer omfattende holdbarhetsforsøk for amfetaminene. Holdbarhet ble undersøkt i prøver med plasma eller spytt tilsatt analytter ved oppbevaring i 24 timer ved romtemperatur, ved å fryse og tine prøvene tre ganger og i frosne prøver etter én og to måneder. De rapporterer heller ingen problemer med holdbarheten til analyttene.

4.3.13 Ioneratio

For ioneratioen er det anbefalt at avviket ikke skal være større enn ± 20 % fra referanseprøven. Dette er undersøkt i tre analyseserier og er oppfylt for alle analyttene. De største avvikene for hver analytt i løpet av tre analyseserier er presentert i tabell 4.12.

Tabell 4.12: Største prosentvise avvik for ioneratioen fra referanseprøve (gjennomsnitt av standard 2 og 3) i tre analyseserier med standarder, kvalitetskontroller og pasientprøver (16 amfetaminprøver og 17 ritalinsyreprøver).

Analytt	Største avvik fra ref. prøve [%]
Amfetamin	15,4
Metamfetamin	-5,5
MDA	8,2
MDMA	16,7
Ritalinsyre	-12,6

4.3.14 Retensjonstid

Variasjonen i relativ retensjonstid er $< 0,6 \%$ for alle analyttene. Dette er innenfor kravet på $\pm 1 \%$.

4.3.15 Spesifisitet

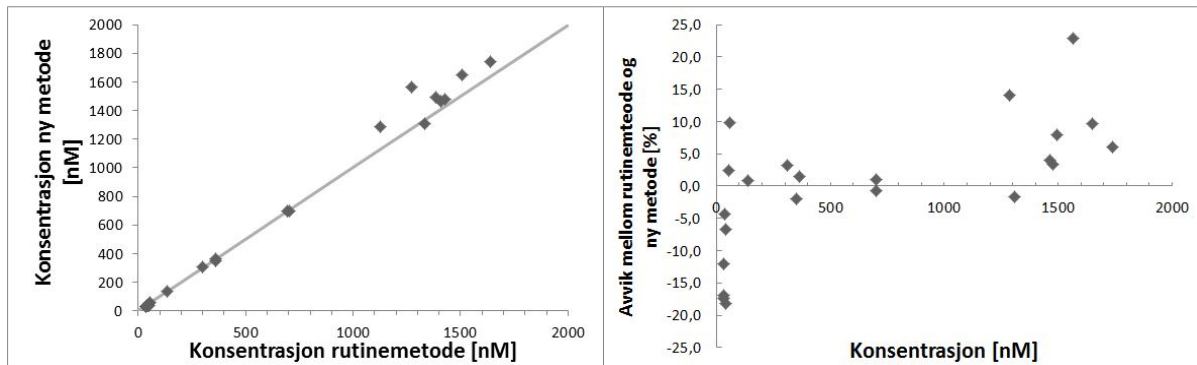
Meprobamat og PMMA ble analysert for å undersøke om de gir falske positive resultat. Analyse av meprobamat ga ingen respons i kromatogrammene. I kromatogrammene med analyse av PMMA ble det identifisert en topp for både MDA og metamfetamin. Kun den ene MRM-overgangen var til stede for MDA, og vil derfor ikke bli rapportert som falskt positivt resultat. For metamfetamin var det en topp for begge MRM-overgangene. Ioneratioen var 0,3 sammenlignet med standardene som hadde en ioneratio lik 2,1. Dermed vil heller ikke denne gi utslag som falskt positivt resultat.

De analyserte forbindelsene er kun de analyttene som allerede analyseres ved AKF som har molarmasse $\pm 1 \text{ g/mol}$ i forhold til analyttene i metoden. Ingen av disse gir falske positive resultater. Andre forbindelser som ikke er i analysereportoaret til AKF kan allikevel gjøre det.

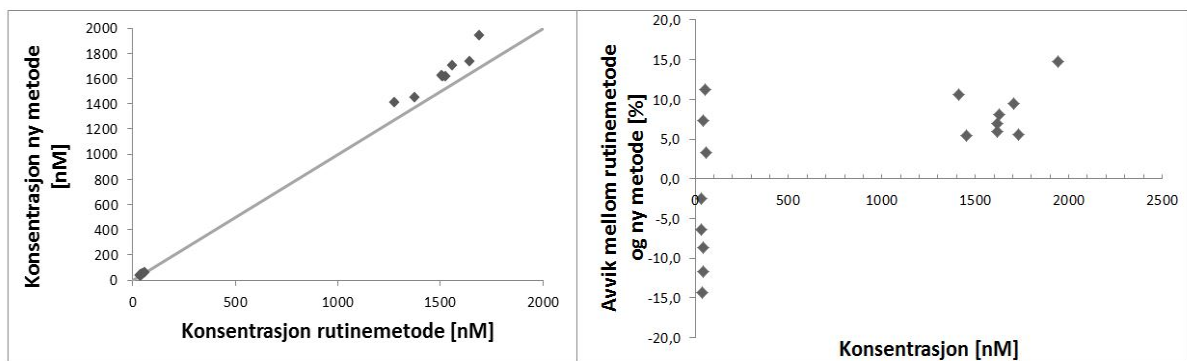
4.3.16 Metodesammenligning

Resultatene fra sammenligning av dagens rutinemetode og den nye metoden for pasientprøver er plottet for hver analytt i figur 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 og 4.8. Konsentrasjon i pasientprøver fra eksisterende og ny metode er plottet mot hverandre, og avviket mellom metodene er plottet mot konsentrasjonen i den nye metoden.

4. RESULTATER OG DISKUSJON

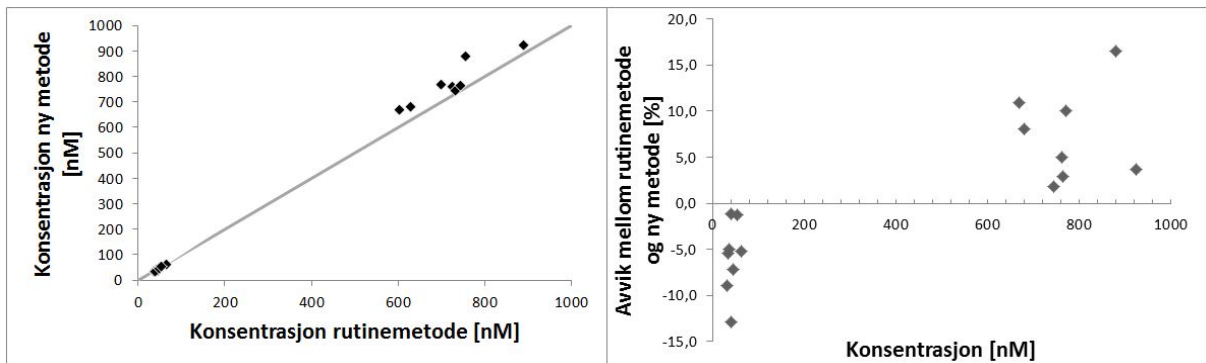


Figur 4.4: Amfetamin: Konsentrasjon i 22 pasientprøver med rutinemetode plottet mot ny metode (til venstre). Avvik i ny metode i forhold til rutinemetode er plottet mot konsentrasjon i den nye metoden (til høyre).

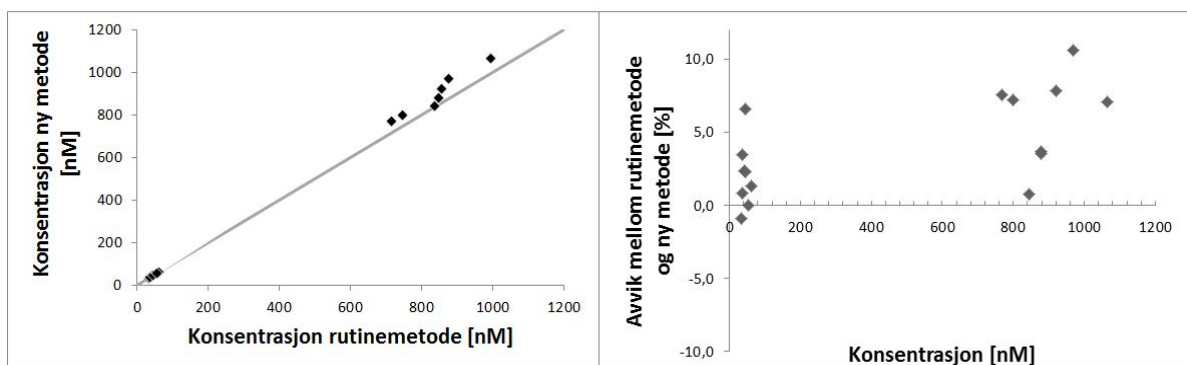


Figur 4.5: Metamfetamin: Konsentrasjon i 16 pasientprøver med rutinemetode plottet mot ny metode (til venstre). Avvik i ny metode i forhold til rutinemetode er plottet mot konsentrasjon i den nye metoden (til høyre).

4. RESULTATER OG DISKUSJON

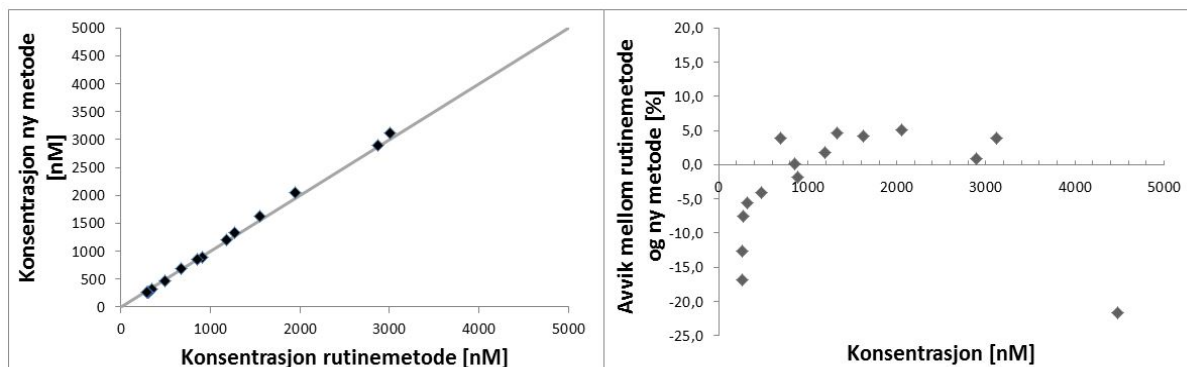


Figur 4.6: MDA: Konsentrasjon i 16 pasientprøver med rutinemetode plottet mot ny metode (til venstre). Avvik i ny metode i forhold til rutinemetode er plottet mot konsentrasjon i den nye metoden (til høyre).



Figur 4.7: MDMA: Konsentrasjon i 16 pasientprøver med rutinemetode plottet mot ny metode (til venstre). Avvik i ny metode i forhold til rutinemetode er plottet mot konsentrasjon i den nye metoden (til høyre).

4. RESULTATER OG DISKUSJON



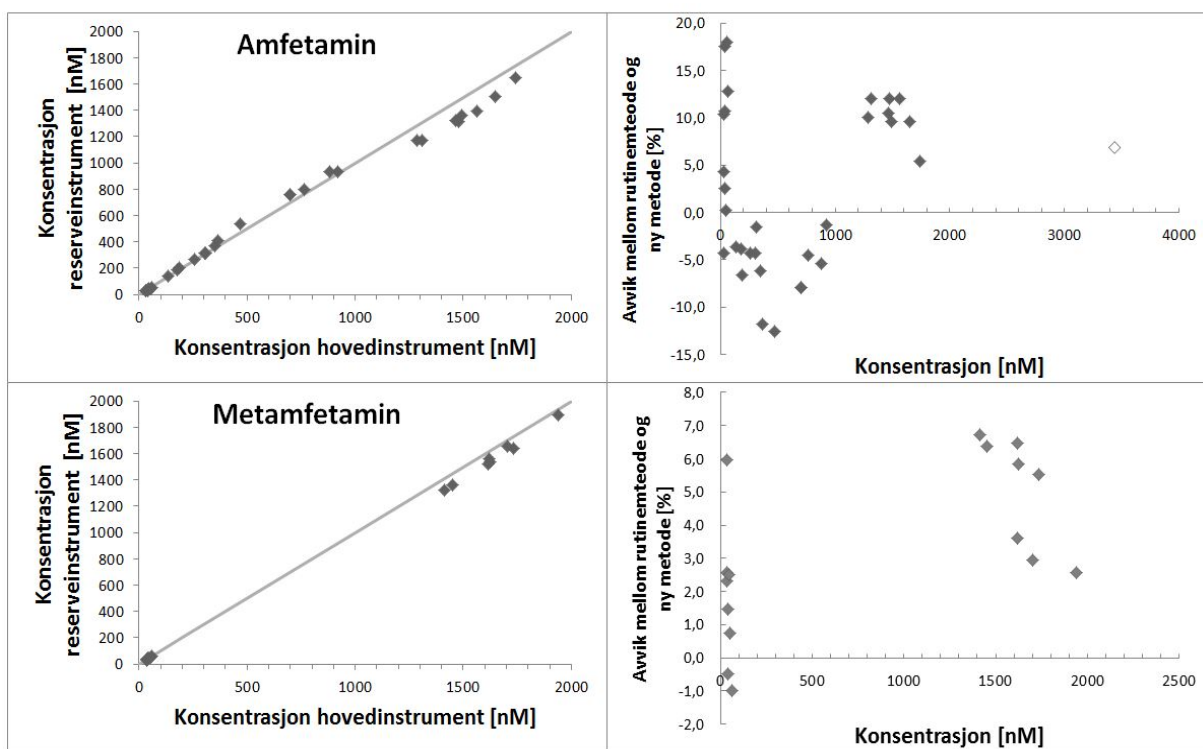
Figur 4.8: Ritalinsyre: Konsentrasjon i 17 pasientprøver med rutinemetode plottet mot ny metode (til venstre). Avvik i ny metode i forhold til rutinemetode er plottet mot konsentrasjon i den nye metoden (til høyre).

For alle analyttene er avvikene akseptable. Bortsett fra ei måling for amfetamin er alle avvik $< 20\%$. For alle analyttene bortsett fra ritalinsyre, er trenden at den nye metoden gir høyere verdier i den øvre delen av måleområdet. For ritalinsyre er det god overensstemmelse i hele måleområdet. Ettersom det ikke analyseres SLP-prøver for amfetaminene, kan det ikke slås fast hvilken av metodene som gir mest korrekt resultat. For ritalinsyre er det analysert for få SLP-prøver til å kunne si med sikkerhet hvor god den eksisterende og den nye metoden er. Avdelingen bør vurdere om det skal gjennomføres en ringtest med flere laboratorier for disse analyttene i serum.

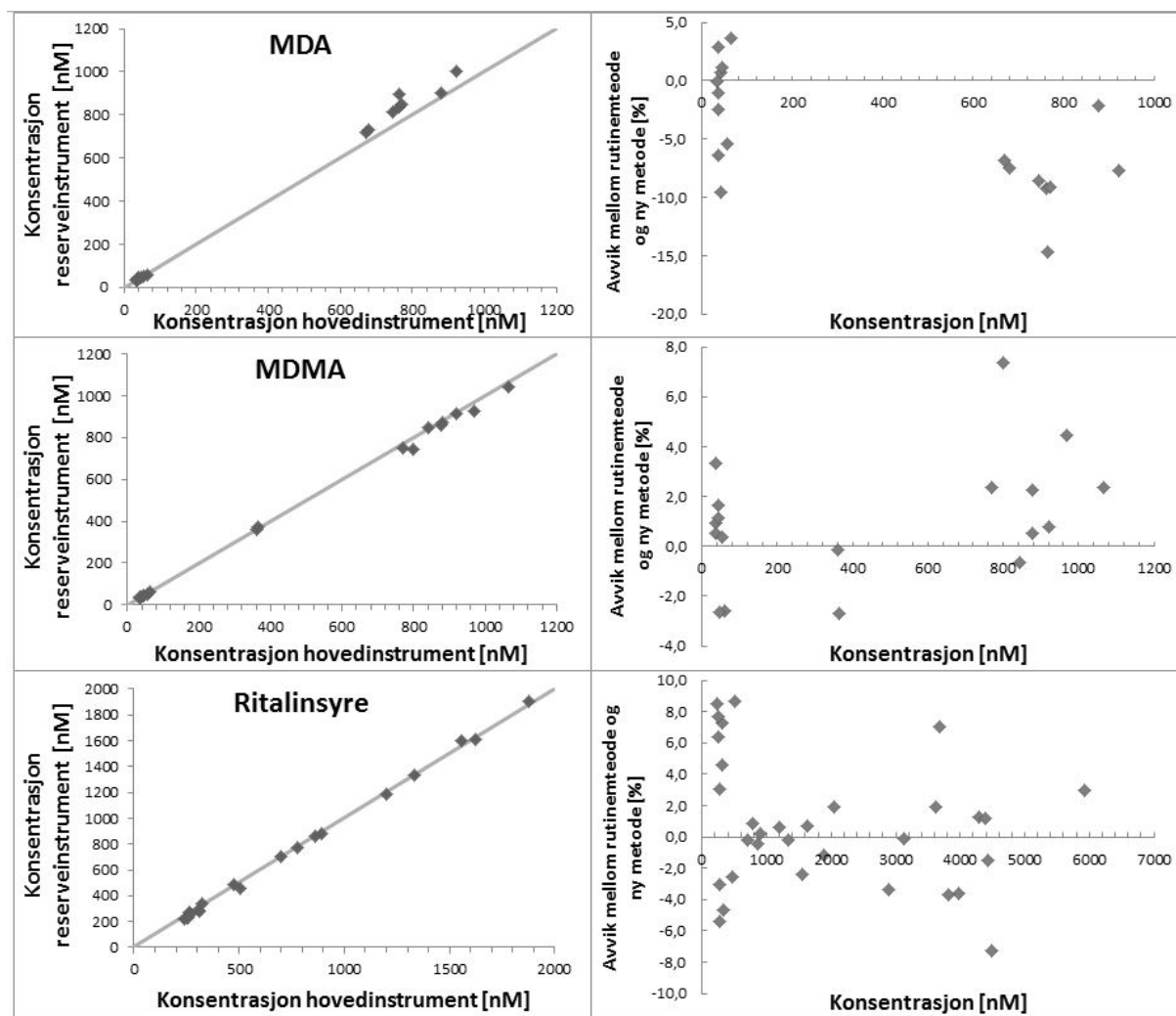
4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.3.17 Samkjøring mellom instrumenter

Resultatene for samkjøring mellom hovedinstrumentet og reserveinstrumentet er plottet i figur 4.9



4. RESULTATER OG DISKUSJON



Figur 4.9: Plott av konsentrasjon og avvik målt med hovedinstrument mot reserveinstrument for amfetamin ($n=32$), metamfetamin ($n=16$), MDA ($n=18$), MDMA ($n=18$) og ritalinsyre ($n=32$).

For alle analyttene er avvikene $< 20\%$. Avvikene for metamfetamin er i hovedsak positive, som kan tyde på en konstant forskjell mellom instrumentene. Avvikene er $< 7\%$, og har ikke stor innvirkning på resultatene. Plottene for de øvrige analyttene tyder verken på en konstant eller en proporsjonal forskjell mellom instrumentene.

Det er ikke observert større avvik i analyseserien som ble analysert to påfølgende dager i forhold de seriene som ble analysert samme dag. Holdbarhetsforsøkene viser også at holdbarheten av opparbeidede prøver er god og at dette derfor ikke vil ha noen innvirkning på resultatene i samkjøringen.

5 Konklusjon

Det ble utviklet en ny sensitiv, selektiv og robust analysemetode ved bruk av UHPLC-MS/MS for amfetamin, metamfetamin, MDA, MDMA og ritalinsyre i serum.

Rutinedriften vil effektiviseres ved å slå sammen to eksisterende metoder til én samt benytte en enklere prøveopparbeidelse. I den nye metoden vil proteinfelling og 96-brønns fosfolipidfjerningsplater bli benyttet. Prøveopparbeidelsen er delvis automatisert med Hamilton pipetteringsrobot. Sammenlignet med eksisterende metode, med manuell prøveopparbeidelse og bruk av SPE og LLE, er denne metoden mindre arbeidskrevende, og er mindre belastende for armer og skuldrer. Det vil også bli brukt betydelig mindre løsemidler, og den kreftfremkallende forbindelsen diklormetan som idag brukes ved LLE, anvendes ikke i den nye metoden. Prøvevolumet, analysetiden og antallet kalibreringsstandarder er redusert.

Nye ^{13}C -merkede intern-standarder ble tatt i bruk for amfetamin, metamfetamin, MDA og MDMA. For ritalinsyre ble en ny deuterert intern-standard tatt i bruk. Valideringen viste at disse intern-standardene korrigerer for matrikseffekter.

Alle de undersøkte valideringsparametrene linearitet, repeterbarhet, reproduserbarhet, nøyaktighet, matrikseffekter, ekstraksjonsutbytte, variasjon i intern-standard, holdbarhet i opparbeidede prøver, ioneratio, retensjonstid og spesifisitet var innenfor de gitte kravene. Forsøkene viste 20 % (av arealet til laveste standard) overdrag av metamfetamin, etter analyse av HøyStd. Etter høyeste standard (standard 5) var overdraget for metamfetamin 11 %. Med bakgrunn i dette skal det i rutineanalyser injiseres standard 0 etter høyeste kalibreringsstandard. I tillegg skal pasientprøver reinjiseres dersom metamfetamin-konsentrasjonen til prøven foran i analyseserien er over måleområdet.

Metodesammenligning viste at forskjellene mellom den eksisterende og den nye metoden er < 20 %. Samkjøring av de to analyseinstrumentene viste også at forskjellen mellom hoved- og reserveinstrumentet er < 20 %.

Validering av denne analysemetoden er utført med tilsats av syre (HCl) under prøveopparbeidelse. Resultatene viste at dette ikke var nødvendig for å unngå at amfetamin fordampet. Dette skyldes trolig at fellingsreagenset acetonitril er tilsatt 1 % maursyre. Hvis tilsetning av HCl skal fjernes fra metoden, må metoden delvis valideres på nytt.

Etter gjennomførte holdbarhetsforsøk, med resultater innenfor kravene, vil analysemetoden kunne implementeres i rutinebruk.

Referanser

- (1) Pitt, J. J. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews* **2009**, *30*, 19.
- (2) Peters, F. T. Recent advances of liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Clinical Biochemistry* **2011**, *44*, Mass Spectrometry in Laboratory Medicine, 54–65.
- (3) Grebe, S. K., Singh, R. J. LC-MS/MS in the clinical laboratory—where to from here? *The Clinical Biochemist Reviews* **2011**, *32*, 5.
- (4) Mørland, J., Dietrichs, E. S. Sentralstimulerende midler., Hentet: 25.09.17 fra https://sml.snl.no/sentralstimulerende_midler.
- (5) Vardanyan, R., Hruby, V., *Synthesis of Best-Seller Drugs*; Elsevier Science: 2016, s. 145–147.
- (6) *Norsk legemiddelhandbok: L6.8.1 Metylfenidat og lisdeksamfetamin/deksamfetamin/amfetamin*; Spigset, O., Melien, Ø., Bjørner, T., Jodalen, H., Pettersen, R., Viktil, K. K., Wang, S., Wæhre, T., red.; Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhandbok: 2016.
- (7) Lovdata: Narkotikaforskriften., Hentet 07.06.18 fra https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2013-02-14-199/KAPITTEL_1#KAPITTEL_1.
- (8) Hansen, M. Kvantifisering av amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i serum – bruk av pipetteringsrobot og UHPLC-MS/MS. **2017**, TKJ4540 Analytisk kjemi, fordypningsoppgave (ikke publisert).
- (9) Sikkerhetsdatabladdiklormetan. *Sigma Aldrich* **2015**, *Utgave 7*.
- (10) Miljødirektoratet: Substitusjonsplikten., Hentet 07.06.18 fra <http://www.miljodirektoratet.no/Documents/publikasjoner/M104/M104.pdf>.
- (11) Wibetoe, G. Validering. *Store norske leksikon* **2017**, Hentet 21.03.18 fra <https://snl.no/validering>.
- (12) Schumacher, G. E., Barr, J. T. Therapeutic Drug Monitoring. *Clinical Pharmacokinetics* **2001**, *40*, 405–409.
- (13) Wiencek, J. R., Colby, J. M., Nichols, J. H. i *Chapter Five - Rapid Assessment of Drugs of Abuse, Advances in clinical chemistry*; Elsevier: 2017; bd. 80, s. 193–225.
- (14) Pedersen-Bjerregaard, S., Rasmussen, K., *Legemiddelanalyse*; Fagbokforlaget: 2004.
- (15) MDMA (Ecstasy/Molly), National Institute of Drug Abuse. **2016**, Hentet 10.11.17 fra <https://www.drugabuse.gov/publications/drugfacts/mdma-ecstasy-molly>.

- (16) Felleskatalogen: Ritalin., red. av Legemiddelindustrien, Hentet 01.05.18, <https://www.felleskatalogen.no/medisin/ritalin-novartis-563557>.
- (17) Lin, S.-N., Andrenyak, D. M., Moody, D. E., Foltz, R. L. Enantioselective Gas Chromatography-Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry for Methylphenidate in Human Plasma. *Journal of Analytical Toxicology* **1999**, *23*, 524–530.
- (18) Hammes, S., Klubnes, C. Holdbarhetsstudie av methylfenidat i serum analysert på LCMS. *Høgskolen i Sør-Trøndelag* **2010**, Bacheloroppgave.
- (19) Pedersen, B. Amfotært stoff., Hentet 23.05.18 fra https://snl.no/amfot/T1/aert_stoff.
- (20) Hansen, S., Pedersen-Bjergaard, S., *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*; Wiley: 2015.
- (21) Fossum, S. Fosfolipider. *Store medisinske leksikon* **2009**.
- (22) Remane, D., Wissenbach, D. K., Peters, F. T. Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology — An update. *Clinical Biochemistry* **2016**, *49*, Mass Spectrometry, 1051–1071.
- (23) Alkarawi, D. The Investigation of the Electrical Control of Hemimicelles and Admicelles on Gold for Analyte Preconcentration., masteroppg., Western Kentucky University, 2016.
- (24) Bjørk, M. K., Simonsen, K. W., Andersen, D. W., Dalsgaard, P. W., Sigurðardóttir, S. R., Linnet, K., Rasmussen, B. S. Quantification of 31 Illicit and Medicinal Drugs and Metabolites in Whole Blood by Fully Automated Solid-phase Extraction and Ultra-performance Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, *405*, 2607–2617.
- (25) Del Mar Ramirez Fernandez, M., Samyn, N. Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Method for the Analysis of Amphetamines in Plasma. *Journal of analytical toxicology* **2011**, *35*, 577–582.
- (26) Phree Phospholipid Removal Solutions., Hentet 12.12.17 fra http://phx.phenomenex.com/lib/br13070413_w.pdf; Phenomenex, 2013.
- (27) Sergi, M., Bafile, E., Compagnone, D., Curini, R., D’ascenzo, G., Romolo, F. Multiclass Analysis of Illicit Drugs in Plasma and Oral Fluids by LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2009**, *393*, 709–718.
- (28) Nilsen, M. Kvantitativ høytrykksvæskeskromatografi tandemmassespektrometri analyse av amfetaminer i blod., masteroppg., Universitet for miljø og biovitenskap, 2012.
- (29) Lundanes, E., Reubsaet, L., Greibrokk, T., *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*; Wiley: 2013.

- (30) Cheng, Y.-F., Walter, T. H., Lu, Z., Iraneta, P., Alden, B. A., Gendreau, C., Neue, U. D., Grassi, J. M., Carmody, J. L., O Gara, J. E. mfl. Hybrid organic-inorganic particle technology: breaking through traditional barriers of HPLC separations. *LC GC* **2000**, *18*, 1162–1173.
- (31) BEH (Ethylene Bridged Hybrid) Technology., Hentet 21.03.18 fra http://www.waters.com/waters/en_NO/BEH-%28Ethylene-Bridged-Hybrid%29-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_NO; Waters.
- (32) ACQUITY UPLC Columns., Hentet 21.11.17 fra http://www.waters.com/waters/en_NO/ACQUITY-UPLC-Columns/nav.htm?locale=en_NO&cid=513206; Waters, 2017.
- (33) Dong, M. W., Zhang, K. Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *63*, UHPLC: Where Are We 10 Years After Its Commercial Introduction?, 21–30.
- (34) Differences Between Using Acetonitrile and Methanol for Reverse Phase Chromatography., Hentet 29.11.17 fra <https://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lctalk/35/35lab.html>; SHIMADZU.
- (35) Liu, R., Jiang, A.-l., Bian, L.-l., Shao, F., Ma, Z.-l., Yu, B. The comparison between LC-UV and LC-MS in analysis of polyphenolic components from leaves of *Crataegus L.* *Zhong yao cai = Zhongyao cai = Journal of Chinese medicinal materials* **2007**, *30* 3, 285–289.
- (36) Suneetha, A., Rajeswari, K. R. Comparison of LC-UV and LC-MS methods for simultaneous determination of teriflunomide, dimethyl fumarate and fampridine in human plasma: application to rat pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, *30*, 1371–1377.
- (37) Ho, C., Lam, C., Chan, M., Cheung, R., Law, L., Lit, L., Ng, K., Suen, M., Tai, H. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *The Clinical Biochemist Reviews* **2003**, *24.1*, 3–12.
- (38) Schmidt, A., Picotti, P., Aebersold, R. Proteomanalyse und Systembiologie. *Biospektrum* **2008**, *14*, 44.
- (39) Panuwet, P., Hunter Jr, R. E., D’Souza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Marder, M. E., Kartavenka, K., Ryan, P. B., Barr, D. B. Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing biomonitoring. *Critical reviews in analytical chemistry* **2016**, *46*, 93–105.
- (40) Poole, C., *The Essence of Chromatography*; Elsevier: 2003.

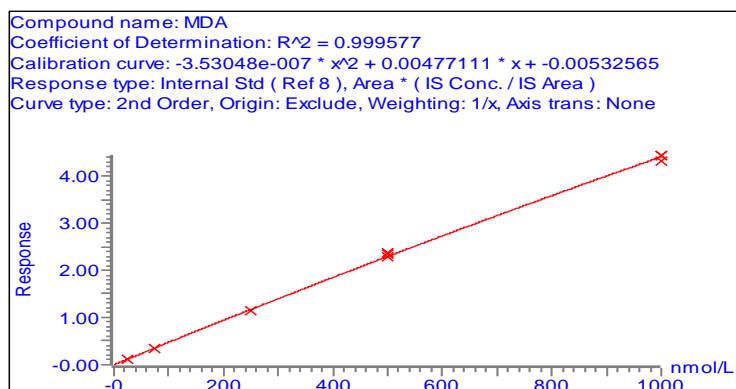
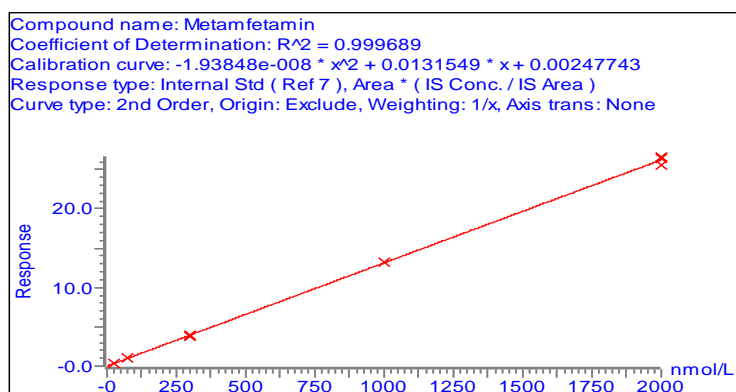
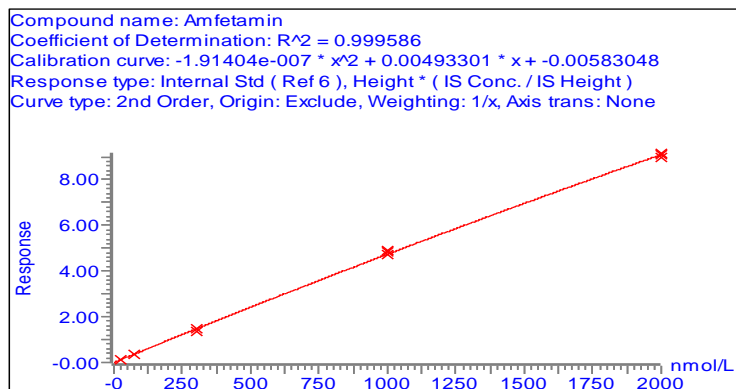
- (41) McCoy, R., Aiken, R., Pauls, R., Ziegel, E., Wolf, T., Fritz, G., Marmion, D. Results of a cooperative study comparing the precision of peak height and area measurements in liquid chromatography. *Journal of chromatographic science* **1984**, *22*, 425–431.
- (42) Pauls, R., McCoy, R., Ziegel, E., Wolf, T., Fritz, G., Marmion, D. Results of a cooperative study comparing the precision of peak height and area measurements in liquid chromatography. Part II. *Journal of chromatographic science* **1986**, *24*, 273–277.
- (43) Berg, T., Strand, D. H. ¹³C labelled internal standards—A solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 9366–9374.
- (44) Berg, T., Karlsen, M., Øiestad, Å. M. L., Johansen, J. E., Liu, H., Strand, D. H. Evaluation of ¹³C- and ²H-labeled internal standards for the determination of amphetamines in biological samples, by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1344*, 83–90.
- (45) Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, Food and Drug Administration., Hentet 14.05.18 fra <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm368107.pdf>.
- (46) Armbruster, D. A., Pry, T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical Biochemist Reviews* **2008**, *29*, S49.
- (47) Bansal, S., DeStefano, A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *The AAPS journal* **2007**, *9*, E109–E114.
- (48) González, O., Blanco, M. E., Iriarte, G., Bartolomé, L., Maguregui, M. I., Alonso, R. M. Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1353*, 10–27.
- (49) Matuszewski, B., Constanzer, M., Chavez-Eng, C. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC- MS/MS. *Analytical chemistry* **2003**, *75*, 3019–3030.
- (50) Krueve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M.-L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., Leito, I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. *Analytica chimica acta* **2015**, *870*, 29–44.
- (51) akkreditering, N. Hva er akkreditering., Hentet 08.06.18 fra <http://www.akkreditert.no/no/hva-er-akkreditering/>.
- (52) Bjørgen, M., Svelle, S., Eid, H. M. A., Aerts, M. Måler vi riktig? Sammenlignende laboratorieprøving - hva, hvorfor og hvordan! *Kjemi* **2017**, *77*, 4–7.

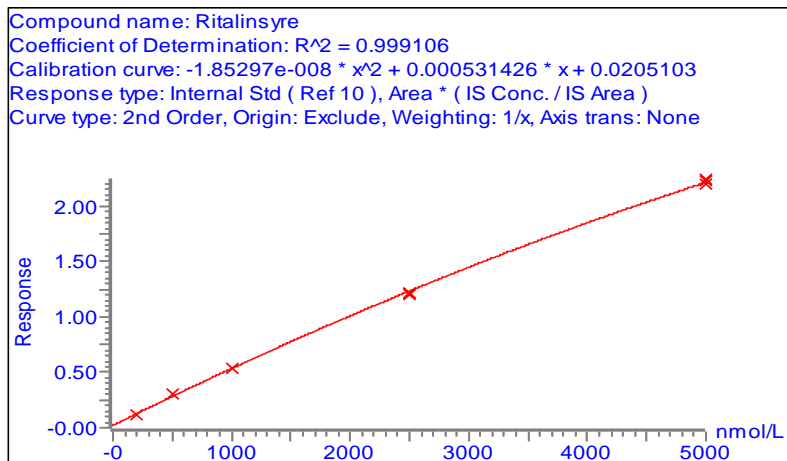
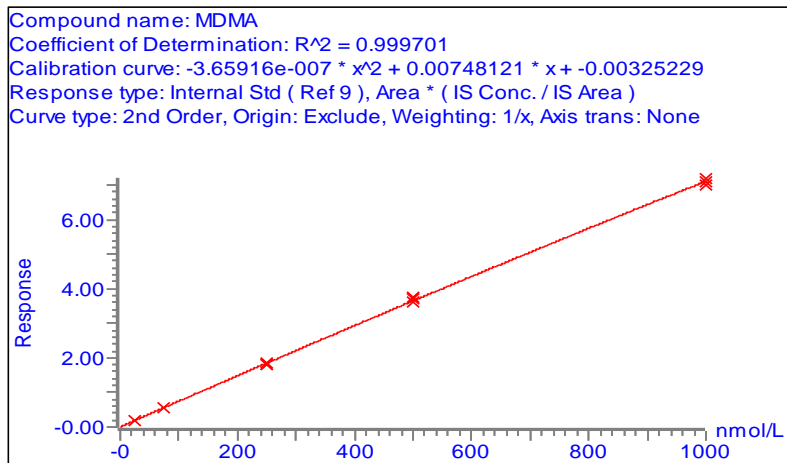
- (53) No, A., Committee, A. M. mfl. z-Scores and other scores in chemical proficiency testing—their meanings, and some common misconceptions. *Analytical Methods* **2016**, *8*, 5553–5555.
- (54) Hegstad, S., Hermansson, S., Betnér, I., Spigset, O., Falch, B. M. H. Screening and quantitative determination of drugs of abuse in diluted urine by UPLC–MS/MS. *Journal of Chromatography B* **2014**, *947-948*, 83–95.
- (55) SOFT/AAFS Forensic Toxicology Laboratory Guidelines., Hentet 04.06.18 fra http://www.soft-tox.org/files/Guidelines_2006_Final.pdf.
- (56) Reddy, I. M., Beotra, A., Jain, S., Ahi, S. A Simple and Rapid ESI-LC-MS/MS Method for Simultaneous Screening of Doping Agents in Urine Samples. *Indian journal of pharmacology* **2009**, *41*, 80.
- (57) Martz, W., Tobias, N., Mühlbauer, B. Determination of Ritalinic Acid in Autopsy Material Using SPE and.
- (58) Cappadona, S., Baker, P. R., Cutillas, P. R., Heck, A. J. R., van Breukelen, B. Current challenges in software solutions for mass spectrometry-based quantitative proteomics. *Amino Acids* **2012**, *43(3)*, 1087–1108.
- (59) Dorothy Yang, D.-H., Murphy, M., Zhang, S. Highly Sensitive Detection of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Water Using an Agilent 6495 Triple Quadrupole Mass Spectrometer Application Note. **2014**.
- (60) Wood, M., De Boeck, G., Samyn, N., Morris, M., Cooper, D., Maes, R., De Bruijn, E. Development of a Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Amphetamines in Human Plasma and Oral Fluid by LC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology* **2003**, *27*, 78–87.
- (61) Kelly, T., Gray, T. R., Huestis, M. A. Development and Validation of a Liquid Chromatography–atmospheric Pressure Chemical Ionization–tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Analysis of 10 Amphetamine-, Methamphetamine- and 3, 4-methylenedioxymethamphetamine-related (MDMA) Analytes in Human Meconium. *Journal of Chromatography B* **2008**, *867*, 194–204.
- (62) Dams, R., Huestis, M. A., Lambert, W. E., Murphy, C. M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2003**, *14*, 1290–1294.
- (63) Bonfiglio, R., King, R. C., Olah, T. V., Merkle, K. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13*, 1175–1185.

- (64) Wohlfarth, A., Weinmann, W., Dresen, S. LC-MS/MS Screening Method for Designer Amphetamines, Tryptamines, and Piperazines in Serum. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2010**, *396*, 2403–2414.
- (65) Mortier, K. A., Maudens, K. E., Lambert, W. E., Clauwaert, K. M., Van Bocxlaer, J. F., Deforce, D. L., Van Peteghem, C. H., De Leenheer, A. P. Simultaneous, Quantitative Determination of Opiates, Amphetamines, Cocaine and Benzoyllecgonine in Oral Fluid by Liquid Chromatography Quadrupole-time-of-flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* **2002**, *779*, 321–330.
- (66) Concheiro, M., dos Santos Sadler Simoes, S. M., Quintela, O., de Castro, A., Dias, M. J. R., Cruz, A., Lopez-Rivadulla, M. Fast LC–MS/MS Method for the Determination of Amphetamine, Methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in Urine. *Forensic Science International* **2007**, *171*, 44–51.

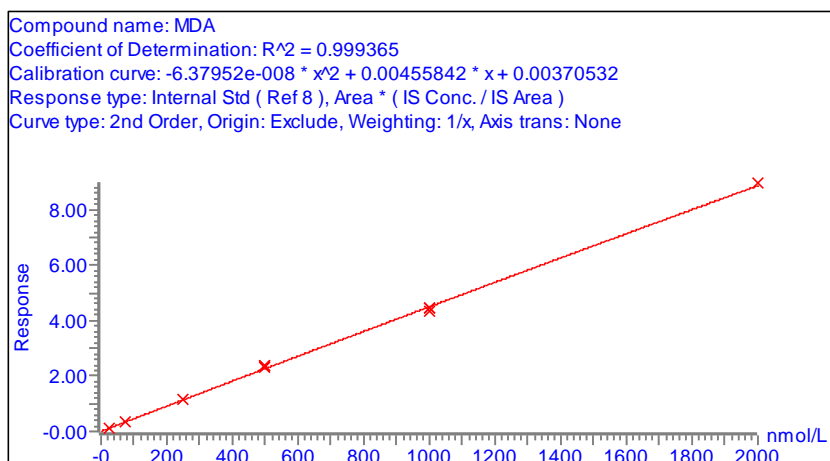
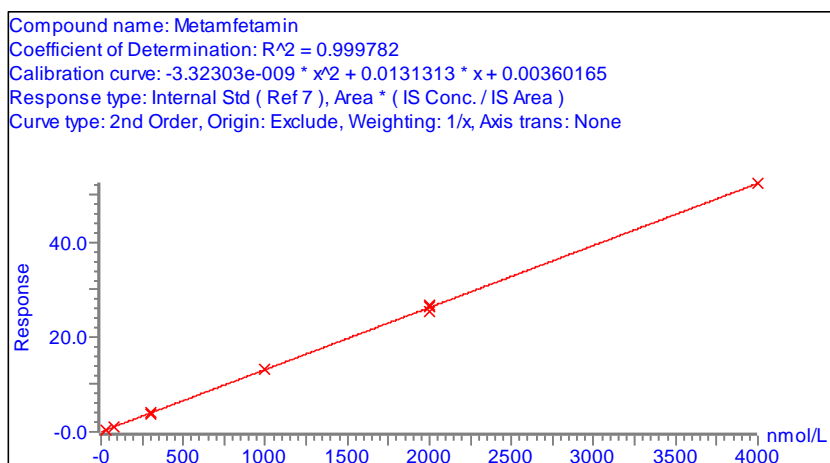
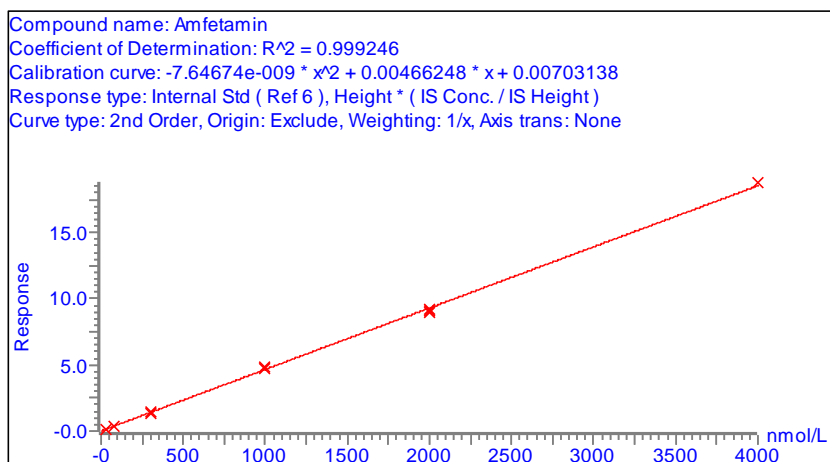
A Vedlegg

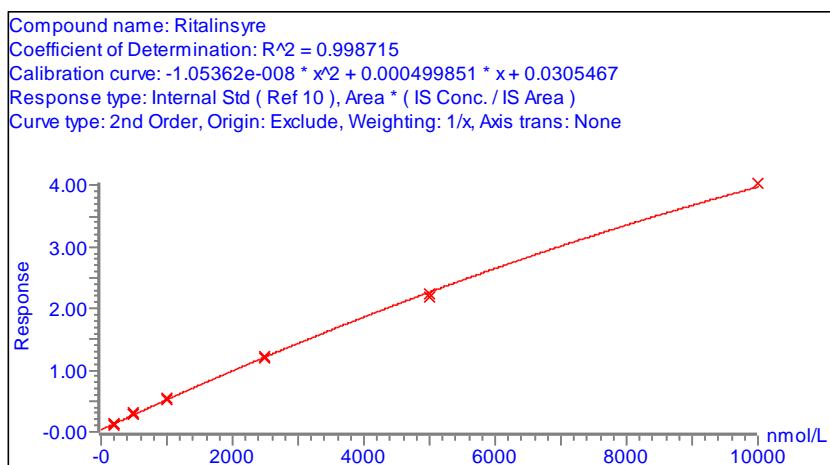
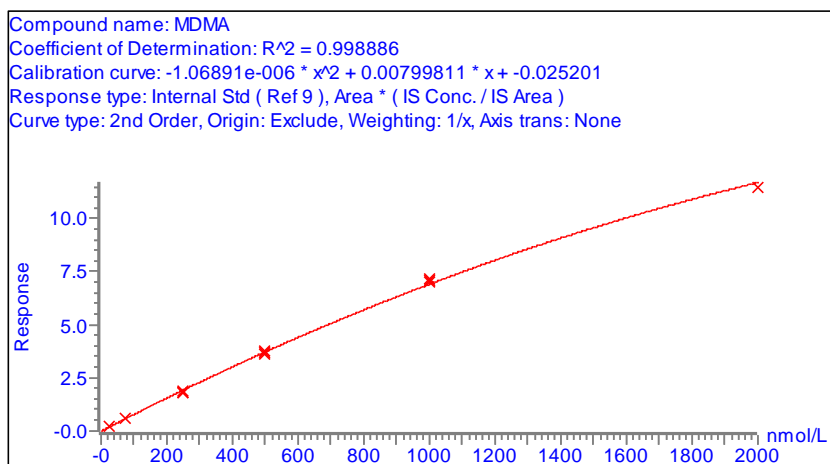
A.1 Kalibreringskurver





A.2 Kalibreringskurver med HøyStd





A.3 Valideringsplan

Avdeling for klinisk farmakologi

St. Olavs Hospital

HELSE  MIDT-NORGE

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

	Signatur / dato
Metodeutvikler/Dokumenteier	Minam Hansen 19.03.18 Solfred Hegstøl 19.03.18
Godkjent/ Valideringsansvarlig	Tine N. Andreassen 22/3-18
Godkjent/ Seksjonsleder analytisk FoU	Berit Lasse Faleh 19/3-18
Godkjent/ Medisinsk faglig ansvarlig	Arvid Kjet 19/3-18

VALIDERINGEN OMFATTER

- Fullvalidering, ny metode
- Validering av metodeendring
- Forenklet validering, ny metode

INNHOLDSFORTEGNELSE

1	Innledning	2
2	Omfang	5
3	Ansvar	5
4	Metodikk	5
4.1.	Analytisk prinsipp	5
4.2.	Metodeutvikling	5
5	Materialer og utstyr	6
5.1.	Kjemikalier	6
5.2.	Instrumenter, utstyr og software	7
5.3.	Prøvemateriale	8
5.4.	Standardløsninger (Std)	8
5.5.	Kontroll-løsninger (QC)	8
5.6.	Intern-standard (IS)	8
6	Prøvepreparering	9
7	Analysebetingelser	10
7.1.	Væskerkromatografi – massespektrometri	10
8	Valideringsparametere og akseptkriterier	12
8.1.	Deteksjons- og kvantifiseringsgrense (LOD/LOQ)	12
8.2.	Standardkurve – kurvetilpasning og måleområde	12
8.3.	Presisjon	13
8.3.1	Repetisjonsbarhet	13
8.3.2	Reproduserbarhet	13
8.4.	Nøyaktighet	13
8.5.	Repetisjonsbarhet og nøyaktighet for fortynnede prøver	14
8.6.	Selektivitet	14

Side 1 av 21

Dokument 23000 "Valideringsplan MAL – AKF" ver. 1.8 EQS

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

8.7.	Ekstraksjonsutbytte (recovery)	15
8.8.	Overdrag (Carry over)	16
8.9.	Retensjonstid.....	16
8.10.	Stabilitet kvantifiserings-ion vs kvalifiserings-ion	17
8.11.	Robusthet	17
8.12.	IS recovery	17
8.13.	Holdbarhet	18
8.13.1	Holdbarhet av opparbeidede Std, QC og pasientprøver oppbevart kjølig	18
	Andre holdbarhetsforsøk gjennomføres senere.	18
8.13.2	Holdbarhet av Std, QC og/eller pasientprøver (ikke-opparbeidede).....	18
8.14.	Spesifisitet.....	18
8.15.	Metodesammenligning.....	19
8.16.	Samkjøring mellom instrumenter	19
8.17.	Måleusikkerhet.....	19
9	Analyseplan	20
10	Arkivering.....	20
11	Referanser	21

1 INNLEDNING

Det er utviklet en ny metode for analyse av fem sentralstimulerende midler i serum. Sentralstimulerende midler brukes både som illegale rusmidler og til medisinsk bruk. Tidligere ble det brukt to separate metoder for disse fem analyttene. Ritalinsyre ble opparbeidet med fastfaseekstraksjon, mens amfetamin, metamfetamin, MDMA og MDA ble opparbeidet med væske-væskeekstraksjon. Begge metodene ble utført manuelt og analysert på singel-LC-MS.

Metoden RITAMF ble utviklet for å effektivisere, automatisere og unngå bruk av diklormetan (DCM) som ekstraksjonsmiddel. I tillegg var det ønskelig å legge metoden over på UPLC-MSMS, og innføre nye intern standarder.

Matriks: serum

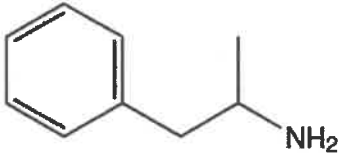
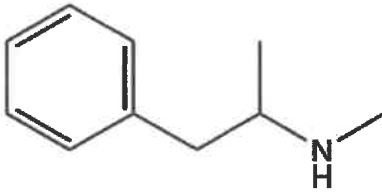
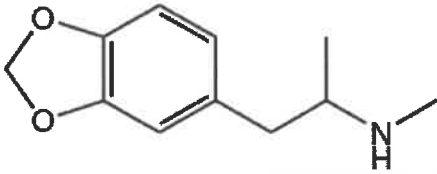
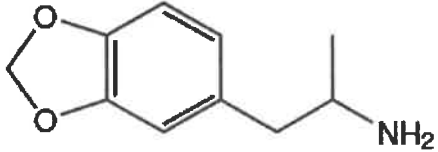
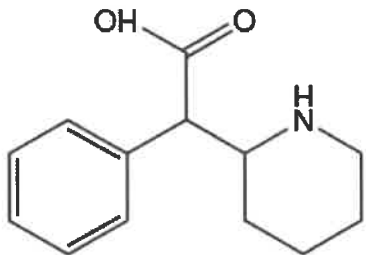
Prøvevolum: 100 µl

Måleområde: se Tabell 1-1

Instrument: LC-MSMS G og LC-MSMS H

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Tabell 1-1: Analyttene og IS i metoden; kjemisk struktur, molekylvekt, pKa-verdi og måleområde. Mw: molekylvekt, average mass

<i>Analytt</i>	<i>Struktur</i>	<i>Mw</i> ¹	<i>pKa</i> ¹	<i>Måleområde (nmol/l)</i>
Amfetamin		135,2	10,1	25-2000
Metamfetamin		149,2	9,87	25-2000
3,4-metylendioksymetamfetamin (MDMA)		193,2	10,14 ^A	25-1000
3,4-metylendioksyamfetamin (MDA)		179,2	9,7 ^C	25-1000
Ritalinsyre		219,3	3,73 ^B 10,08 ^A	200-5000

1) www.drugbank.ca

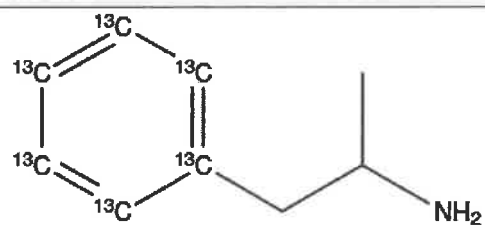
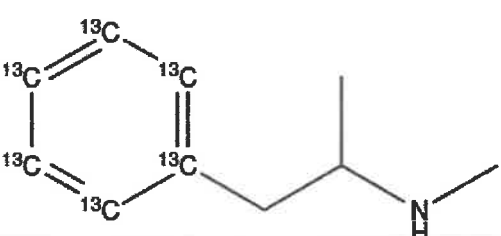
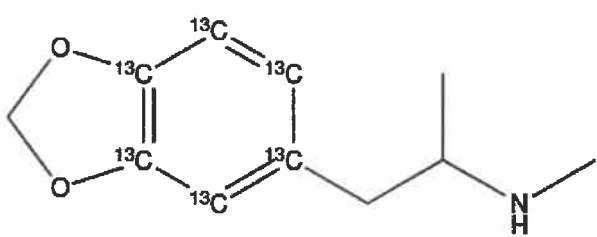
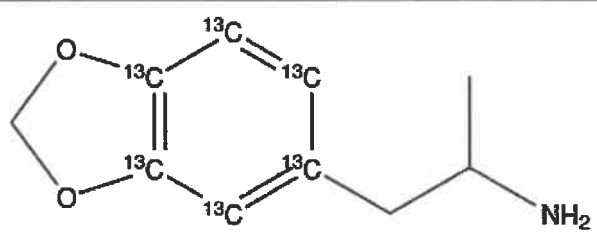
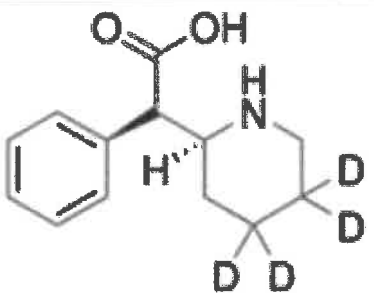
A) Sterkeste base, teoretisk verdi (www.drugbank.ca)

B) Sterkeste syre, teoretisk verdi (www.drugbank.ca)

C) <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-9623EN.pdf>

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Tabell 1-2: Intern standard, kjemisk struktur, molekylvekt

IS	Struktur	Mw(g/mol)
Amfetamin-13C6		141,2
Metamfetamin-13C6		155,2
MDMA-13C6		199,2
MDA-13C6		185,2
Ritalinsyre-d4		223,3

Validering av metoden vil bli utført i henhold til gjeldende standarder og guidelines for valideringen ISO/IEC 15189 [1], og Guidance for industry, bioanalytical method validation [2], SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines 2006 [3] og NA Dok.nr. 50 [4].

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

2 OMFANG

Valideringsplanen omfatter spesifikasjon av metodens akseptkriterier og bestemmelse av metodens egenskaper ved spiking av standardløsninger og kontrollprøver av serum med kjente mengder amfetamin, metamfetamin, MDMA, MDA og ritalinsyre.

3 ANSVAR

Tabell 3-1: Roller og Ansvar

Navn / ID	Rolle	Ansvar
Miriam Hansen	Dokumenteier/metodeutvikler	Masteroppgave
Miriam Hansen	Analytiker 1	Praktisk utførelse
Solfrid Hegstad	Analytiker 2	Praktisk utførelse

4 METODIKK

4.1. Analytisk prinsipp

Serum tilsettes intern-standard og iskald ACN med 1 % FAc i Ostro™ 96-brønnsplate ved hjelp av Hamilton pipetteringsrobot. Ekstraksjonen utføres ved hjelp av Positive Pressure Processor (PPP). Saltsyre tilsettes eluatet før det dampes til tørrhet på Ultravap. Dette er for å unngå at amfetamin fordampes sammen med løsemiddelet. Prøven reløses i 10 % metanol i vann og analyseres på UPLC-MSMS med elektronspray-ionisering (ESI) ved positivt modus.

4.2. Metodeutvikling

Metodeutviklingen er presentert i rapporten «Prosjektoppgave_Kvantifisering av amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i serum» i I:\STOLAV - Farmakologi\Studenter\Masteroppgaver\Master_2017_2018

Kolonnene HSS T3, BEH C18 og BEH fenyl ble testet. Mobilfasene 0,1 % maursyre i vann og metanol, 5 mM NH₄-format pH 10,1 og metanol/acetoneitril ble testet. BEH C18-kolonnen ga best separasjon av analyttene. 5 mM NH₄-format pH 10,1 og acetoneitril ga mindre bakgrunn og færre blindtopper sammenlignet med de andre mobilfasene. Disse ble derfor valgt i videre optimalisering. Ulike inlet-metoder og prøveopparbeidelse med forskjellige fosforlipidfjerningsplater ble også testet.

Inndamping og reløsning av prøvene ble nødvendig fordi signalet til amfetamin var lavt og toppene brede. Dette førte til at MDMA og MDA gikk i metning ved de høyeste standardene (2000 nM). I samarbeid med medisinsk ansvarlig ble det avgjort at det var akseptabelt å senke den høyeste standarden for MDMA og MDA fra 2000 nM til 1000 nM på grunn av få positive prøver over 1000 nM. På grunn av lavt signal for amfetamin ble injeksjonsvolumet økt til 2 µl. Gain ble satt ned til 0,5 for å unngå at de høyeste standardene gikk i metning.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

5 MATERIALER OG UTSTYR

5.1. Kjemikalier

Tabell 5-1 – Kjemikalier

<i>Produkt</i>	<i>CAS-nr.</i>	<i>Artikkelnr.</i>	<i>Lot-nr.</i>	<i>Kvalitet</i>	<i>Produsent / leverandør</i>
Acetonitril (MF/felling)	75-05-8	83642.320	17F061386	LiChrosolv hypergrade for LC-MS	Merck/VWR International
Maurisyre (felling)	64-18-6	1.00264.1000	K49102964720	EMSURE ACS 98-100 %	Merck/ VWR
Metanol (reløsning)	64-18-6	1.06035.2500	I0892835	LiChrosolv hypergrade for LC-MS	Merck / VWR International
Saltsyre	7647-01-0	20252.420	14F050514	37 %	VWR International
Ammoniumformat (MF)	540-69-2	51691-100G	MKBL3276V	≥99,995 % trace metals basis	ALDRICH
Ammoniumhydroksiløsning (MF)	1336-21-6	22122-1L-M	STBG8939	28-30 %	ACS reagent, Sigma-Aldrich
Renset vann				Se tabell 5-3	

Tabell 5-2 – Referansestoffer

<i>Stoffets navn</i>	<i>CAS-nr.</i>	<i>Artikkelnr.</i>	<i>Lot-nr.</i>	<i>Produsent / leverandør</i>
Amfetamin-SO ₄ (Std)	60-13-9	AMP-95-SU	95.1B8.1	Lipomed
Amfetamin-HCl(QC)	2706-50-5	9156.9	13764	Chiron
Metamfetamin-HCl(Std)	51-57-0	M8750	070M1307V	Sigma Aldrich
Metamfetamin-HCl(QC)	51-57-0	M8750	ANR.9K011/1	NMD/ Sigma Aldrich
MDMA-HCl(Std)	64057-70-1	MDM-94-HC	94.1B4.2	Lipomed
MDMA-HCl(QC)	64057-70-1	9164.11	11 172	Chiron
MDA-HCl(Std)	6292-91-7	MDA-79-HC	79.1B16.2	Lipomed
MDA-HCl(QC)	6292-91-7	9162.10	11 171	Chiron
Ritalinsyre-HCl(Std)	19395-40-5	10268.13	14 025	Chiron
Ritalinsyre-HCl(QC)	19395-40-5	R533110	1-SAZ-49-1	TRC
Amfetamin- ¹³ C ₆	1419916-80-5	9676.9-50-ME	16141	Chiron
Metamfetamin- ¹³ C ₆	1419916-80-5	9677.10-1MG	10643	Chiron
MDMA- ¹³ C ₆	1536079-50-1	10023.11-1MG	12616	Chiron
MDA- ¹³ C ₆ HCl	1536075-11-2	10022.10-1MG	12621	Chiron
Ritalinsyre-D ₄	N/A	R-025 X	FN04151506	Cerilliant /Sigma Aldrich

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

5.2. Instrumenter, utstyr og software

Tabell 5-3 Instrument, utstyr, software

<i>Instrument, utstyr, software</i>	<i>Modell/Type</i>	<i>Artikkel-/lotnr., versjonsnr.</i>	<i>Produsent/leverandør</i>
Vannrenseanlegg (i to steg)	Elix5 MilliQ-Element	SN:F3AN87610E SN:F6PN85273E	Millipore
Mikrorør og rack til standard- og kvalitetskontroll-prøver	MATRIX ScreenMates Tubes 1,4 ml in Latch Racks	Art.nr. 4247	Thermo Scientific
Korker til mikrorør	SepraSeal Cap Mats	Art. nr. 4463	Thermo Scientific
Prøverør	tt-rør 14 x 81 mm	Art.nr. 1002 Art.nr. 150922	HEGER A/S / Hovedlager St. Olavs hospital
Propp til prøverør	Propp til tt-rør 14 mm	Art.nr 1151	HEGER A/S / Hovedlager St. Olavs hospital
Plate-mixer	Co-mix Multi format	SN.00104	Vitl Life Science solution /teknolab
Ostro™ 96-brønnsplate	Ostro™ 96-Well Plate 25mg 1/Pkg	Partnr: 186005518	Waters
96-brønnsplate 2 ml	2 ml Square Well Collection Plate	Art. nr. 186002482	Waters
Hamilton pipetteringsrobot (B)	Hamilton ML Star	9455	Hamilton Robotics AB
PPP-modul til prøvefiltrering	Positive Pressure Processor	Art.nr 186005521	Waters
Inndamper	Ultravap	Art. nr. 108.229135	PortvairSciences/Te knolab
Forseglingsmatte for 2ml 96-brønnsplate	Cap-mat square plugs, Silicone/PTFE treated, pre slit	Art. nr 186005521	Waters
Forkolonne	VanGuard™ BEH C18 1,7 µm	Art.nr. 186003975/*	Waters
Analytisk kolonne	Acquity UPLC®BEH C18 1, 7 µm, 2,1x 50 mm	Art,nr. 186002350/*	Waters
ACQUITY UPLC® I-Class	Acquity Column Manager AUX	Serienr.G: J13CMX895G Serienr.H: J15CMX664G	Waters
	Acquity Column Manager	Serienr.G: L13CMP782G Serienr.H: B16CMP912G	Waters
	Acquity Sample Organizer	Serienr.G: G13CPO651M Serienr. H: L15CPO494H	Waters
	Acquity Sample Manager-FTN	Serienr.G: J13USM217G Serienr. H: F15USM291M	Waters
	Acquity Binary Solvent Manager	Serienr.G: K13BUR759M Serienr. H: H15BUR169M	Waters
Detektor/MSMS	Xevo TQS MS	Serienr.G: WAA965 Serienr. H: WAC 1550	Waters
Instrument software, UPLC-MSMS	MassLynx		Waters

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

5.3. Prøvemateriale

0-serum fra kalibreringslaboratoriet blir spiket med standard (Std)- og kvalitetskontroll (QC)-bruksløsninger. I tillegg vil pasientprøver og eksterne kvalitetskontroller (for ritalinsyre) bli benyttet under validering.

5.4. Standardløsninger (Std)

Standardrekker som benyttes under valideringen spikes fra bruksløsninger laget ved kalibreringslaboratoriet, se Tabell 5-4. Standardløsninger som benyttes under valideringen merkes med 01/18. Standardløsningen fordeles i matriksrør og oppbevares ved -20 °C.

Tabell 5-4 Standardløsninger og HøyStd

<i>Stoff</i>	<i>Std1 (nM)</i>	<i>Std2 (nM)</i>	<i>Std3 (nM)</i>	<i>Std4 (nM)</i>	<i>Std5 (nM)</i>	<i>HøyStd (nM)</i>
Amfetamin	25,0	75,0	300	1000	2000	4000
Metamfetamin	25,0	75,0	300	1000	2000	4000
MDMA	25,0	75,0	250	500	1000	2000
MDA	25,0	75,0	250	500	1000	2000
Ritalinsyre	200	500	1000	2500	5000	10000

5.5. Kontrolløsninger (QC)

Kontrolløsninger som benyttes under valideringen, spikes fra bruksløsninger laget ved kalibreringslaboratoriet. Kontrolløsningene som benyttes under valideringen, merkes med 01/18, se Tabell 5-5. Kontrolløsningene fordeles i matriksrør og oppbevares ved -20 °C.

Tabell 5-5 Kontrolløsninger

<i>Stoff</i>	<i>LavQC (nM)</i>	<i>QC1 (nM)</i>	<i>QC2 (nM)</i>	<i>QC3 (nM)</i>
Amfetamin	25,0	40,0	200	1500
Metamfetamin	25,0	40,0	200	1500
MDMA	25,0	40,0	150	800
MDA	25,0	40,0	150	800
Ritalinsyre	200	300	750	4000

5.6. Intern-standard (IS)

Intern-standardløsningen som benyttes under valideringen lages ved kalibreringslaboratoriet. Intern-standardløsningen som benyttes under valideringen merkes med 01/18, og lagres ved 4 °C.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Tabell 5-6 Intern-standard

<i>Stoff</i>	<i>Konsentrasjon (ng/ml)</i>	<i>Konsentrasjon (nM)</i>	<i>Løsningsmiddel</i>
Amfetamin-13C6	50	354	20 % MeOH i H ₂ O (v/v)
Metamfetamin-13C6	50	322	
MDMA-13C6	80	402	
MDA-13C6	100	540	
Ritalinsyre-d4	50	224	

6 PRØVEPREPARERING

- 100 µL prøve/Std/QC pipetteres i Ostro™ 96-brønnsplate (Hamilton B).
- 25 µL IS-løsning tilsettes med åtte kanaler.
- 375 µL fellingsreagens (iskald ACN m/ 1 % FAc) tilsettes med 96-hodet, og roboten stopper i 10 sekunder.
- Prøvene blandes ved at Hamilton aspirerer og dispenserer tre ganger.
- Ostro™ 96-brønnsplaten flyttes over i PPP-enhet. En Waters 2 ml 96-dypbrønnsplate (eluatplate) plasseres under for å samle opp eluatet. Trykket stilles på 4 psi, og justeres deretter for å oppnå en dråpehastighet på 0,5-1 dråpe pr sekund. Etter to minutter justeres trykket opp ca. 2 enheter, og står slik i ytterligere ett minutt. Før Ostro-platen og eluat-platen skilles gis de et lett bank mot bordet slik at eventuelle dråper som henger under Ostro-brønner faller ned i riktig brønn.
- 10 µL 0,3 M HCl tilsettes eluatplaten ved bruk av Multipipette.
- Platen settes på risteren for dypbrønnsplater med 500 rpm i 20 sekunder på program MIX 500.
- Innholdet i eluatplaten dampes inn ved hjelp av inndamper, 40 °C i 40 min (program 2 på Ultravap).
- 100 µL 10 % MeOH i vann (v/v) tilsettes ved bruk av Multipipette.
- Forseglingssmatte settes på.
- Platen settes på risteren/shakeren for dypbrønnsplater. Benytt program DWP-96 2000 60 (1 min ved 2100 omdreininger). Prøven i eluatplaten er nå klar for analyse.

<i>Beskrivelse</i>	<i>Prøve/reagenser/utstyr</i>	<i>Volum</i>	<i>Posisjon Hamilton</i>
Prøver	Std/QC/SLP	100 µl	Spor 39, pos 5
	Pasientprøver	100 µl	Spor 51 - 54
	Intern-standard: RITAMF-IS	25 µl	Spor 47, pos 4
Plate	Ostro		Spor 39, pos 4. Står på en mikrotiterplate.
Fellingsreagens	Iskald ACN m/ 1% FAc ^{xiii}	375 µl	Spor 39, pos 3
Engangsspisser	MLStar 300 µl standard volum		Spor 21, pos 4

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

	spiss med filter		Spor 27, pos 4
Engangsspisser	MLStar 300 µl standard volum spiss (uten filter)		Spor 21, pos 3 Spor 27, pos 3
Engangsspisser	MLStar 1000 µl standard volum spiss med filter		Spor21, pos 2
Engangsspisser	MIStar 50 µl standard volum spiss med filter		Spor 21, pos 5

Hamilton B:

Script: Ritamf_validering

7 ANALYSEBETINGELSER

7.1. Væskekromatografi – massespektrometri

Tabell 7-1 Analysebetingelser

Injeksjonsvolum	2 µl
Kolonne-temperatur	50 °C
Autosample-temperatur	10 °C
Pre Inject Wash	10 s
Post Inject Wash	15 s
Needle placement	Automatic
Mobilfase:	Løsning A: 5 mM NH ₄ -format, pH 10,1 Løsning B: Acetonitril

Tabell 7-2 HPLC/UPLC- program

Tid (min)	Løsn. A (%)	Løsn. B (%)	Flow (ml/min)	Kurve
1,0	95	5	0,6	Initial
2,0	72	28	0,6	6
2,2	2	98	0,6	6
3,0	95	5	0,6	1
3,2	95	5	0,6	1
10,0	95	5	0	11

Stopp-tid: 3,2 min

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Tabell 7-3 MS-program og forventet retensjonstid (RT)

<Positiv mode (ESI) MRM >							
Stoff	SIM ion/Overgang (m/z)		Fragmentor/ cone (V)	CE (eV)	Dwell-tid (sek)	Intern-standard	RT (min)
	Kvantifiserings-ion	Kvalifiserings-ion					
Amfetamin	135,9>119		20	8	0,005	Amfetamin-13C6	1,45
		135,9>91	20	15	0,005	Amfetamin-13C6	1,45
Metamfetamin	150>119		20	15	0,005	Metamfetamin-13C6	1,58
		150>91	20	40	0,005	Metamfetamin-13C6	1,58
MDMA	194>133		20	20	0,005	MDMA-13C6	1,52
		194>105	20	22	0,005	MDMA-13C6	1,52
MDA	180>133		20	17	0,005	MDA-13C6	1,41
		180>163	20	17	0,005	MDA-13C6	1,41
Ritalinsyre	220>56		40	40	0,047	Ritalinsyre-d4	0,92
		220>174	40	20	0,047	Ritalinsyre-d4	0,92
Amfetamin-13C6	142>97		20	15	0,005		1,45
Metamfetamin-13C6	156>125		20	15	0,005		1,58
MDMA-13C6	200>139		20	20	0,005		1,52
MDA-13C6	186>139		20	17	0,005		1,41
Ritalinsyre-d4	224>88		40	20	0,047		0,91

Tabell 7-4 Instrumentelle innstillinger i ionekilden

Kapillærspenning (kV)	1,0
Ionekildetemperatur (°C)	120
Desolvation temperatur (°C)	650
Cone gas flow (l/h)	150
Desolvation gas flow (l/h)	1000
Gain	0,5

Tabell 7-9 Analysebetingelser – Metodenavn

<i>UPLC metode</i>	FOU_RITAMF_S_G/FOU_RITAMF_S_H
<i>MSMS metode</i>	FOU_RITAMF_S_G/FOU_RITAMF_S_H
<i>MS tune-fil</i>	FOU_RITAMF_S_G/FOU_RITAMF_S_H
<i>Processing method</i>	RITAMF_S_validering_xv

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

8 VALIDERINGSPARAMETERE OG AKSEPTKRITERIER

Avleste verdier er basert på areal.

8.1. Deteksjons- og kvantifiseringsgrense (LOD/LOQ)

Anbefalt akseptkriterier for LOD og Std1:

- LOD; $S/N \geq 3$ for kvantifiserings-ionet og $S/N \geq 3$ for kvalifiserings-ioner.
- Std1; $S/N \geq 30$ for kvantifiserings-ionet og $S/N \geq 10$ for kvalifiserings-ioner.
- Std1: Variasjonskoeffisient $CV < 20\%$ og avvik nøyaktighet mindre enn $\pm 20\%$.
- Interferens-responsen i blankprøvene bør være 15% eller mindre sammenlignet med analyttresponsen i Std1.

Utførelse:

LOQ er lik Std1

- Et anslag av LOD gjøres ved å lage en fortynningsrekke av Std1.
- En QC-løsning (LavQC) med konsentrasjon som Std1 inkluderes i valideringen. Alle punktene på standardkurven benyttes ved beregning av LavQC.
- Det analyseres ti serier med LavQC (gjøres på ulike dager). S/N beregnes for LavQC hver av analysedagene. I tillegg oppgis CV (%) og gjennomsnittlig avvik nøyaktighet (%).

8.2. Standardkurve – kurvetilpasning og måleområde

Kurvetilpasning og måleområde for de enkelte analytter som inngår i metoden, bestemmes ut i fra fem (Std1-Std5) ulike konsentrasjoner, jevnt fordelt over analyttenes måleområde.

Anbefalte akseptkriterier for kurvetilpasning:

- Forklaringskoeffisient (coefficient of determination) $R^2 \geq 0,995$ for kvadratisk kurvetilpasning.
- Tre paralleller hvor gjennomsnitt av målingene for hver konsentrasjon skal ligge innenfor $[90\%, 110\%]$ av teoretisk verdi.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

- Residualene skal være uavhengige og tilfeldig fordelt omkring null.

Utførelse:

- Det benyttes fem konsentrasjoner av standardløsning med tre paralleller på hvert nivå. Kvadratisk kurvetilpasning med 1/x-vektning og exclude.
- I tillegg til kalibreringskurve for de enkelte analyttene, inkluderes tilhørende residualplot, R^2 , gjennomsnittlig konsentrasjon og CV (%) (for hvert nivå) i rapporten.
- Det tas med en ekstra standardløsning med konsentrasjon som er 200 % av standard 5 (HøyStd). Dette vil gi informasjon om standardkurvens videre forløp på oversiden av måleområdet.

8.3. Presisjon

Presisjon undersøkes ved repeterbarhet og reproduserbarhet. Medisinskfaglig ansvarlig har godkjent følgende akseptkriterier [5]:

Anbefalte akseptkriterier for

- repeterbarhet: CV \leq 10,0 %
- reproduserbarhet: CV \leq 15,0 %

Utførelse:

8.3.1 Repeterbarhet

- Repeterbarhet (innen serievariasjon) bestemmes ved bruk av tre konsentrasjoner av QC-løsninger (QC1, QC2 og QC3) med ti paralleller på hvert nivå.

Repeterbarhet rapporteres som gjennomsnitt og CV (%) på hvert konsentrasjonsnivå.

8.3.2 Reproduserbarhet

- Reproduserbarhet (mellom serievariasjon) bestemmes ved bruk av tre konsentrasjoner av QC-løsninger (QC1, QC2 og QC3) med en prøve på hvert nivå. Opparbeidelse skal utføres av to analytikere, og arbeidet skal gjentas over ti dager

Reproduserbarhet rapporteres som gjennomsnitt og CV (%) på hvert konsentrasjonsnivå.

8.4. Nøyaktighet

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Én SLP fra LGC for ritalinsyre tas med i valideringen. De andre analyttene er ikke inkludert i pågående SLP-program ved avdelingen. Nøyaktighet bestemmes fra spikede prøver, og oppgis som avvik (%) fra teoretisk verdi.

Anbefalte akseptkriterier for nøyaktighet:

- Avvik fra teoretisk verdi: $\leq 15,0 \%$
- SLP: $|Z| \leq 2$

Utførelse:

- Reproduserbarhetsdata fra pkt 8.3 benyttes til å beregne nøyaktighet

Resultatene rapporteres som gjennomsnitt av seriene på hvert nivå mot spiket konsentrasjon, og ut i fra dette beregnes avvik fra teoretisk verdi som oppgis som nøyaktighet.

Ut i fra analyseresultatene beregnes Z-verdier for SLP-prøven på følgende måte:

$$Z = \frac{(\text{Målt verdi ny metode}) - (\text{Assigned value})}{(\text{SDPA})}$$

Assigned value = gjennomsnittsverdi beregnet av SLP-leverandør basert på innrapporterte resultater fra de ulike laboratorier.

SDPA = Standard Deviation for Proficiency Assessment beregnet av SLP-leverandør basert på innrapporterte resultater fra de ulike laboratorier.

8.5. Repterbarhet og nøyaktighet for fortynnede prøver

Spikede Std over høyeste standard i metoden fortynnes og analyseres

Utførelse:

- HøyStd fortynnes 1:5 og 1:10 med 0-matriks. n = 3 for hver fortynningsgrad. Utføres én gang.

Repterbarhet rapporteres som gjennomsnitt og CV (%) på hvert konsentrasjonsnivå. Nøyaktighet rapporteres som relativ differanse mellom det beregnede gjennomsnittet av hvert nivå mot den spikede konsentrasjonen.

8.6. Selektivitet

Anbefalte akseptkriterier for selektivitet:

- Interferens fra blankmatriks bør være $\leq 15 \%$ av Std1, se pkt 8.1.
- Dersom interfererende topper er til stede, bør oppløsningsfaktor Rs være $\geq 1,5$
- ME anbefales å ligge i område 75 % - 125 % (korrigert med IS).
- Variasjon (CV) for ME bør være $\leq 15 \%$

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Utførelse:

- Sjekk Std0 (null-matriks tilsatt kun IS). Undersøk kromatogrammene visuelt for interfererende topper i tidsområdet (retensjonstid) der analyttene er forventet å eluere. Tilsvarende undersøkelse gjøres for null-matriks fra seks ulike personer. Hvis det påvises interfererende topper i kromatogrammet gjøres en opparbeidelse uten tilsetning av IS for å undersøke om interferensen stammer fra IS.
- Undersøkelse av matrikseffekter. ME bestemmes på to konsentrasjonsnivåer, QC1 og QC3. Seks ulike matriksprøver opparbeides uten tilsetning av IS og analytt. IS erstattes med 25 µl 20 % MeOH i vann. Etter inndamping reløses prøvene i 100 µl analyttløsning i 10 % MeOH i vann (med konsentrasjon lik QC1 og QC3). I tillegg tilsettes 100 µl av analyttløsningen (DIR*) i tre brønner for hvert QC-nivå. 10 µl IS tilsettes tilslutt QC-prøvene og DIR-løsningene.
- Intensiteten (areal) benyttes for beregning av ME.

Beregning av ME:

$$ME = (\text{Intensitet}_{\text{matriksprøve}} / \text{Intensitet}_{\text{DIRløsning}}) \times 100$$

$$ME \text{ IS-korrigert} = (\text{Intensitet}_{\text{matriksprøve}} / \text{IS-intensitet}_{\text{matriksprøve}}) / (\text{Intensitet}_{\text{DIRløsning}} / \text{IS-Intensitet}_{\text{DIRløsning}}) \times 100$$

*DIR = den fasen som prøven reløses i etter opparbeidelse og eventuelt inndamping, tilsatt analytt(er) og intern-standard

Beregning av løsninger brukt til ME-forsøket:

I:\STOLAV -

Farmakologi\Studenter\Masteroppgaver\Master_2017_2018\Prevalidering\Beregning utbytteløsning

8.7. *Ekstraksjonsutbytte (recovery)*

Ekstraksjonsutbyttet bestemmes på to konsentrasjonsnivå, QC1 og QC3, med seks paralleller på hvert nivå.

Anbefalt akseptkriterium for ekstraksjonsutbytte:

- Ekstraksjonsutbytte: >70 %
- Dersom metoden viser god presisjon mhp repeterbarhet og reproduserbarhet, kan lavere utbytte aksepteres.

Utførelse:

- "Prøve" = Kjent mengde analytt tilsettes matriks før ekstraksjon, mens intern-standard tilsettes etter ekstraksjon.
- "Kontrollprøve" = Både analytt og intern-standard tilsettes etter ekstraksjon.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

- Seks paralleller 0-serum («Prøve») spikeres til QC1 og QC3 før ekstraksjon og ekstraheres uten tilsats av IS. Volumet erstattes med 25 µl 20 % MeOH i vann. I tillegg ekstraheres tolv 0-serum fra samme prøve («kontrollprøve») uten IS. Volumet erstattes med 25 µl 20 % MeOH i vann. Etter inndamping tilsettes 100 µl 10 % MeOH i vann til «prøvene». Til «kontrollprøvene» tilsettes 100 µl analyttløsning i 10 % MeOH i vann. 10 µl IS tilsettes alle brønnene.

Intensiteten (areal) benyttes for beregning av ekstraksjonsutbytte.

Beregning av ekstraksjonsutbytte:

$$\text{Ekstraksjonsutbytte (\%)} = (\text{Intensitet}_{\text{Prøve}} / \text{Intensitet}_{\text{Kontrollprøve}}) * 100$$

Beregning av løsninger brukt til ekstraksjonsutbytte-forsøk:

I:\STOLAV -

Farmakologi\Studenter\Masteroppgaver\Master_2017_2018\Prevalidering\Beregning
g utbytteløsning

8.8. Overdrag (Carry over)

Overdrag under analyse sjekkes etter HøyStd. Da det viste seg at det var overdrag rundt 20 % metamfetamin i prevalideringen, vil også eventuelt overdrag etter Std5 testes i valideringen.

Anbefalt akseptkriterium for overdrag:

- Overdrag: < 20 % av intensitet Std1

Utførelse:

- Først i sekvensen kjøres Std0 (Std0_{før}). Rett etter injeksjon av HøyStd, kjøres Std0 (Std0_{etter}). Kromatogram for Std0_{etter} analysert etter høy standard sammenlignes med kromatogram for Std0_{før} injisert først i sekvensen.

Beregning av overdrag:

$$\text{Overdrag (\%)} = (\text{Intensitet Std0}_{\text{etter}} / \text{Intensitet Std1}) * 100$$

8.9. Retensjonstid

Utførelse:

- Det benyttes Std- og QC-prøver og pasientprøver hvis mulig. Utføres over tre dager.

Retensjonstid/relativ retensjonstid rapporteres som avvik (%) fra (gjennomsnitt av referanseprøve(r) (en eller flere Std)[#]).

XX

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Beregning av relativ retensjonstid:

$$\text{Relativ retensjonstid} = \text{Retensjonstid}_{\text{Analytt}} / \text{Retensjonstid}_{\text{IS}}$$

Anbefalt akseptkriterier for retensjonstid og relativ retensjonstid

- ± 1 % for begge parametere

I MassLynx:

Referanseprøve (QuanRef) vil være gjennomsnitt av Std 2 og Std3.

8.10. Stabilitet kvantifiserings-ion vs kvalifiserings-ion

Ratio for areal mellom kvantifiserings-ion og kvalifiserings-ion undersøkes.

Utførelse:

- Benytt Std- og QC-prøver og pasientprøver hvis mulig. Analyser en serie pr.dag. Utføres over tre dager.

Stabilitet kvantifiserings-ion vs kvalifiserings-ion rapporteres som avvik (%) fra gjennomsnitt av referanseprøver (en eller flere Std), se pkt. 8.8.

Anbefalt akseptkriterium kvantifiserings-ion vs kvalifiserings-ion:

- Avvik: ≤ 20 %

8.11. Robusthet

Robusthet-variabler:

- Drift i en analyseserie mht. intensitet av analytt og IS
- Endre konsentrasjon av 0,3 M HCl som tilsettes før inndamping

Utførelse

- Drift i en analyseserie undersøkes ved å injisere QC2 i starten og slutten av serien. Utføres over tre dager.
- Undersøker hvilken effekt konsentrasjonen av tilsatt syre før inndamping har på resultatene (areal) ved å teste HCl-løsningen med konsentrasjonene 0,20 M, 0,25 og 0,40 M. Gjennomføres med QC1, QC2 og QC3 for hvert konsentrasjonsnivå.

8.12. IS recovery

Undersøker variasjon i areal for IS; alle Std- og QC-nivåer samt pasientprøver.

Utførelse:

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

- Det vil bli benyttet Std- og QC-prøver. Negative pasientprøver benyttes der kun IS recovery vurderes. Analyserer en serie pr. dag. Utføres over tre dager.

IS recovery areal rapporteres som avvik (%) fra gjennomsnitt av Std-rekken.

8.13. Holdbarhet

8.13.1 Holdbarhet av opparbeidede Std, QC og pasientprøver oppbevart kjølig

Std- og QC-løsninger og pasient-prøver (seks ulike personer). Ekstraherte prøver lagres ved 10°C (autosampler) eller 4-8 °C (kjølerom).

Utførelse:

Det benyttes en prøve for QC1, QC3 og pasientprøver. Std- og QC-løsninger samt pasientprøver analyseres. De analyserte Std- og QC-løsninger samt pasientprøver reinjiseres etter tre dager og fem dager. Reinjiserte QC- og pasientprøver leses mot sin egen reinjiserte standardrekke. Alle analyser utføres på samme instrument. Intensiteten for analytt og IS analysert på Dag3 og Dag5 sammenlignes med Dag0 eller teoretisk verdi. Avviket rapporteres som avvik (%) fra Dag0 eller teoretisk verdi.

Anbefalte akseptkriterier:

- Relativt avvik QC $\leq 15\%$
- Relativt avvik pasientprøver $\leq 20\%$.

Andre holdbarhetsforsøk gjennomføres senere.

8.13.2 Holdbarhet av Std, QC og/eller pasientprøver (ikke-opparbeidede)

- Holdbarhet av tinte QC-løsninger ved 4-8°C
- Holdbarhet av ikke-frosne pasientprøver ved 4-8°C
- Holdbarhet av Std/QC-løsninger ved -20°C
- Holdbarhet av prøver i tt-rør ved 30 °C

Utføres ikke:

- Holdbarhet etter frys/tin (3x) av frosne prøver

8.14. Spesifisitet

Det testes et utvalg av stoffer (molekylvekt ± 1 i forhold til analytter i metoden) som kan tenkes å interferere eller gi falske positive resultat., tabell 8-1. Lager løsninger fra bruksløsningene til høyeste standard, og fortynner 1:100 med 10 % MeOH i vann.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

Tabell 8-1 Spesifisitet

Analytt	Molekylvekt	Mulig interfererende forbindelse	Molekylvekt
Ritalinsyre	219,3	Meprobamat	218,25
MDA	179,3	PMMA	179,13

8.15. Metodesammenligning

Utførelse:

Pasientprøver (20-30 prøver) som er analysert med eksisterende rutinemetode og som er positive med en eller flere analytter oppbevares i fryser (-20 °C) fram til analyse. Dersom det er nok prøvevolum (> 1,5 ml), reanalyseres prøvene på begge metoder. Dersom det ikke er tilstrekkelig prøvevolum igjen, reanalyseres prøvene kun på den nye metoden. Prøvesvarene med ny metode sammenlignes med prøvesvarene fra eksisterende rutinemetode.

15-20 ulike negative pasientprøver spikes med bruksløsning QC1 og QC3, analyseres med både eksisterende rutinemetode og den nye metoden som valideres. Alle prøvene som inkluderes i metodesammenligningen må ikke analyseres samme dag, men prøvene skal hvis mulig analyseres samme dag med eksisterende metode og ny metode.

Resultatene rapporteres som % avvik mellom metodene.

8.16. Sankjøring mellom instrumenter

Utførelse:

Det analyseres tre serier på tre forskjellige dager med forskjellige pasientprøver og eventuelt QC-prøver. De ulike seriene bør analyseres samme dag på begge instrumenter. Prøver fra metodesammenligningen benyttes. S/N for Std1 rapporteres. Resultatene rapporteres enten som prosentvis differanse mellom instrumentene og/eller som Passing & Bablok regresjonsplott med tilhørende residualplott.

8.17. Måleusikkerhet

Identifisering og estimering av viktige bidrag til måleusikkerhet. I valideringsrapporten settes det opp en tabell med viktige måleusikkerhetsbidrag (f eks. pipettering av prøve og intern-standard, ekstraksjonsutbytte, instrumentell analyse, holdbarhet og tillaging av standarder). De enkelte bidragene angis som lite, middels eller stort.

Valideringsplan RITAMF, serum, UPLC-MSMS

9 ANALYSEPLAN

Rekkefølgen på dagene kan endres.

Tabell 9.1 – Valideringsoppsett

<i>Dag</i>	<i>Valideringsparameter</i>
1	Nøyaktighet/reproduserbarhet/ LavQC, Linearitet/korrelasjon, overdrag
2	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, repeterbarhet
3	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, utbytte
4	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, selektivitet (ME)
5	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, fortynningsrekke std1 og høy std
6	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, robusthet(syrekons.)
7	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC,
8	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC
9	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC
10	Nøyaktighet/reproduserbarhet, LavQC, spesifisitet
11	Metodesammenligning, samkjøring robusthet(drift i serie), holdbarhet
12 og 13	Samkjøring, robusthet(drift i serie)

10 ARKIVERING

Elektronisk arkivering av rådata, relevante beregninger, informasjon osv. Henvis til aktuell(e) arkiveringsmappe(r) i valideringsrapporten.

Valideringsplan
RITAMF, serum,
UPLC-MSMS

11 REFERANSER

- [1] Medisinske laboratorier. Krav til kvalitet og kompetanse ISO15189:2012.
- [2] Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation, Sept 2013,
(<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm368107.pdf>).
- [3] SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines, 2006 Version.
- [4] NA Dok.nr. 50 Fleksibel akkrediteringsomfang for prøvingslaboratorier.
- [5] I:\STOLAV -
Farmakologi\Studenter\Masteroppgaver\Master_2017_2018\Dokumentasjon\AKF_
Skjema_for_registrering_av_metodekrav_amf_S_revidert_signertJFR