



**FAKULTET FOR NATURVITENSKAP**

## **Institutt for bioingeniørfag**

Norges teknisk- naturvitenskapelige universitet  
Norwegian University of Science and Technology (NTNU)

**Validering av metode for kvantifisering av  
antiepileptika i serum ved bruk av ny detektor  
(Xevo TQ-XS) på UPLC-MSMS**

**Method validation for quantification of  
antiepileptics in serum using a new detector (Xevo  
TQ-XS) on UPLC-MSMS**

*Av / by*

Aina Margrethe Solum, Ellen Johanne Aakre og Sara Sveum

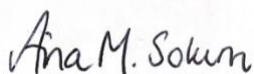
**Trondheim, 2022**

## Forord

Bakgrunnen for denne oppgaven er avsluttende bachelorprosjekt for bioingeniørutdanningen ved Institutt for bioingeniørfag ved Norges tekniske-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven er gitt av Seksjon for analytisk forskning og utvikling (FoU) ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF), en av seks laboratoriemedisinske avdelinger ved St. Olavs hospital i Trondheim. Avdelingen utfører daglig analyser på rus- og legemidler. Analysering av legemidler blir rekvirert ved indikasjon på intoksikasjon, misbruk, forhold som fører til unormal farmakokinetikk, og terapikontroll ved medikamentbehandling.

Oppgaven ble utført på laboratorier og lokaler tilhørende AKF i perioden 9. mars 2022 til 20. mai 2022. Oppgaven er skrevet i godt samarbeid og gjenspeiler kunnskap innhentet gjennom studieperioden og arbeidet med bacheloroppgaven.

Vi vil først og fremst rette en stor takk til vår faglige veileder Maja Loevenich, spesialbioingeniør ved AKF. Tusen takk for god veiledning og hjelp underveis i bachelorperioden. Vi vil også takke Ruth-Anne Larsen, bioingeniør ved AKF, for praktisk veiledning og god opplæring på laboratoriet. Til slutt vil vi takke vår prosessveileder Margareth Nupen, førstelektor ved Institutt for bioingeniørfag ved NTNU, for hjelp underveis i skriveprosessen. Didrik, Tord, Hampus og Lusia har også vært til stor hjelp på hjemmebane. Takk!



Aina Margrethe Solum



Ellen Johanne Aakre



Sara Sveum

*Trondheim 19. mai 2022*

## Sammendrag

Validering av metode for kvantifisering av antiepileptika (karbamazepin, karbamazepinopoksid, likarbazepin og zonisamid) i serum ble gjennomført på MS-detektoren Xevo TQ-XS. Dette er en ny MS-versjon som skal tas i bruk på laboratoriet i tillegg til detektoren som benyttes i dag, Xevo TQ-S. Xevo TQ-XS har høyere sensitivitet, da den detekterer små analytter med mindre masse. Metodens prøveopparbeidelse var proteinfelling og separasjonsprinsippet var omvendt fase-kromatografi.

Grunnlaget for validering av metoden var knyttet til valideringsparametrene kvantifiseringsgrense, linearitet, reproduserbarhet, nøyaktighet, matrikseffekt, IS-recovery og robusthet. Resultater fra analyse av pasientprøver og sammenlignbare laboratorieprøver (SLP) ble sammenlignet med valideringskrav fra laboratoriet.

Resultatet viser at det er linearitet i konsentrasjonsintervallene for de fire antiepileptika (gjennomsnittlig  $R = 0,999$ ). Presisjonen til nedre kvantifiseringsgrense for samtlige antiepileptika hadde  $CV \leq 2,4\%$  og nøyaktighet mellom  $0,0 - 2,7\%$ . Signal/støy-ratio for hvert antiepileptika lå innenfor intervallet  $1900 - 11000$ . Dette indikerer at bakgrunnsstøy gir tilnærmet ingen effekt for deteksjon av antiepileptika. Reproduserbarheten for samtlige antiepileptika hadde  $CV \leq 2,7\%$  og nøyaktighet  $\leq 4,2\%$ . Dette indikerer at påvirkning fra dag til dag på Xevo TQ-XS er minimal.

Z-verdier for karbamazepin, likarbazepin og zonisamid innfrir kravet på  $Z \leq 2$ .

Karbamazepinopoksid må undersøkes videre ( $Z \geq 2$ ). Resultater fra matrikseffekt korrigert med internstandard lå mellom  $99 - 103\%$ . Xevo TQ-XS blir lite påvirket av matriksstanser. Det er ingen betydelige avvik i IS-recovery eller robusthet (drift). Passing and Bablok regresjonsanalyse viser at det er samsvar mellom detektorene.

Undersøkelsen har vist i sin helhet at resultatene innfrir fastsatte valideringskrav, bortsett fra karbamazepinopoksid ( $Z \geq 2$ ). Dette krever videre undersøkelse før Xevo TQ-XS kan anvendes for kvantifisering av antiepileptika i serum.

## Abstract

Method validation for quantification of antiepileptics (carbamazepine, carbamazepinepoxide, licarbazepine and zonisamide) in serum was accomplished on the MS-detector Xevo TQ-XS. This new MS-version is going to be implemented in the laboratory in addition to the detector that is used today, Xevo TQ-S. Xevo TQ-XS has improved sensitivity and can detect small analytes with low molecular mass. The sample preparation used for the method was protein precipitation and the principle for separation was reversed phase chromatography.

The method validation was based on the parameters limit of quantification, linearity, reproducibility, accuracy, matrix effects, IS-recovery and robustness. Results from patient samples and comparable laboratory samples were analyzed and compared with validation requirements used in the laboratory.

The result shows linearity in the concentration intervals for each antiepileptic (mean  $R=0,999$ ). The precision for the low limit of quantification for all the antiepileptics had a  $CV \leq 2,4\%$  and accuracy between  $0,0 - 2,7\%$ . Signal to noise-ratio for each antiepileptic was between  $1900 - 11000$ . This indicates that background noise has virtually no effect on the detection of antiepileptic drugs. The reproducibility for the antiepileptics has  $CV \leq 2,7$  and accuracy  $\leq 4,2\%$ . This indicates that day-to-day impact on the Xevo TQ-XS is minimal.

Z-values for carbamazepine, licarbazepine and zonisamide meet the requirement  $Z \leq 2$ . Carbamazepinepoxide must be investigated further ( $Z \geq 2$ ). Results from matrix effect corrected with internal standard were between  $99 - 103\%$ . Xevo TQ-XS is not largely affected by matrix components. There are no notable deviations for IS-recovery or robustness (drift). Regression analysis from Passing and Bablok shows agreement between the detectors.

The assessment shows that the results meet the requirements for validation, except from carbamazepinepoxide ( $Z \geq 2$ ). This requires further examination before Xevo TQ-XS can be used for quantification of antiepileptics in serum.

## Innholdsfortegnelse

<i>Forord</i> .....	<i>I</i>
<i>Sammendrag</i> .....	<i>II</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>III</i>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Terapikontroll av antiepileptika</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Prøveopparbeidelse</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3 Omvendt fase-kromatografi: Separasjonsprinsipp for antiepileptika på UPLC-MSMS</b> ....	<b>3</b>
<b>1.4 Deteksjonsprinsipp for UPLC-MSMS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.5 Internstandard, standarder og kontroller</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6 Valideringsparametere</b> .....	<b>9</b>
1.6.1 Kvantifiseringsgrense.....	9
1.6.2 Standardkurvens linearitet.....	10
1.6.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet.....	10
1.6.4 Matrikseffekt .....	11
1.6.5 Robusthet.....	12
1.6.6 IS – recovery .....	12
1.6.7 Samkjøring mellom detektorene .....	12
<b>1.7 Problemstillinger</b> .....	<b>13</b>
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Prøvemateriale</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Reagenser og utstyr</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Fremgangsmåte for prøveopparbeidelse</b> .....	<b>16</b>
<b>2.4 Fremgangsmåte for deteksjon av antiepileptika</b> .....	<b>17</b>
<b>2.5 Undersøkelse av valideringsparametere</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Resultater og diskusjon</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Kvantifiseringsgrense</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Standardkurvens linearitet</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet</b> .....	<b>23</b>
<b>3.4 Matrikseffekter</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5 Robusthet</b> .....	<b>27</b>
<b>3.6 IS-recovery</b> .....	<b>28</b>
<b>3.7 Samkjøring mellom detektorene</b> .....	<b>29</b>
<b>4 Konklusjoner</b> .....	<b>38</b>
<b>5 Referanser</b> .....	<b>39</b>
<b>6 Vedlegg</b> .....	<b>42</b>

# 1 Innledning

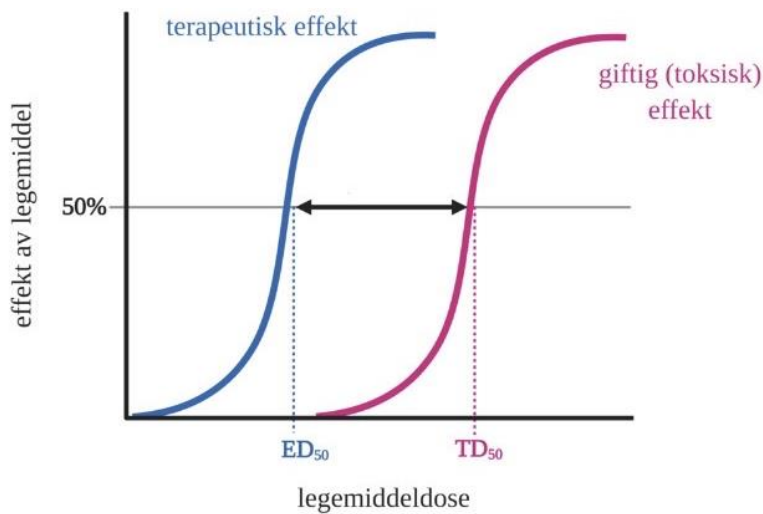
Kromatografiske metoder er separasjons- og deteksjonsmetoder med primært formål å identifisere og kvantifisere analytter basert på deres kjemiske og fysiske egenskaper.

Kvantifisering av antiepileptika (karbamazepin, karbamazepinopoksid, likarbazepin og zonisamid) benytter i dag Ultra performance liquid chromatography (UPLC) og tandem massespektrometri (MSMS) med MS-detektoren Xevo TQ-S. Avdeling for klinisk farmakologi skal i tillegg ta i bruk et nytt UPLC-MSMS-instrument med MS-detektoren Xevo TQ-XS. Denne detektoren har forbedret sensitivitet for analytter og små molekyler med liten masse (1).

Denne oppgaven skal validere metoden for kvantifisering av karbamazepin, karbamazepinopoksid, likarbazepin og zonisamid på Xevo TQ-XS. Undersøkelsen skal omhandle valideringsparametrene kvantifiseringsgrense, linearitet, reproduserbarhet, nøyaktighet, matrikseffekt, robusthet og IS-recovery. Valideringsparametrene vurderes etter gjeldene krav på laboratoriet basert på internasjonale retningslinjer for validering (2).

## 1.1 Terapikontroll av antiepileptika

Ved terapikontroll blir konsentrasjonen av legemiddelet i pasientens blod kvantifisert og sammenlignet med terapeutisk område for analytten. Terapeutisk område er det anbefalte konsentrasjonsområdet for et legemiddel, og ligger innenfor minste effektive konsentrasjon og toksisk område. Effektiv dose gir ønsket effekt hos 50% av brukerne. Overstiger legemiddelkonsentrasjonen en viss dose vil effekten være toksisk. Toksisk dose er den dosen som gir 50% av brukerne toksisk effekt (figur 1). Ytterligere overstigning av toksisk dose gir letal effekt hos 50% av brukerne.



Figur 1: Terapeutisk område ligger mellom terapeutisk effekt ( $ED_{50}$ ) og toksisk effekt ( $TD_{50}$ ) (3).

Det er viktig å kontrollere serumkonsentrasjonen hos pasienter som bruker antiepileptika, da antiepileptika har et smalt terapeutisk område. Det betyr at fare for alvorlige bivirkninger er høy (4). Terapikontroll av pasienter på antiepileptika er nødvendig for å sikre god krampestillende effekt og et minimum av bivirkninger (5).

## 1.2 Prøveopparbeidelse

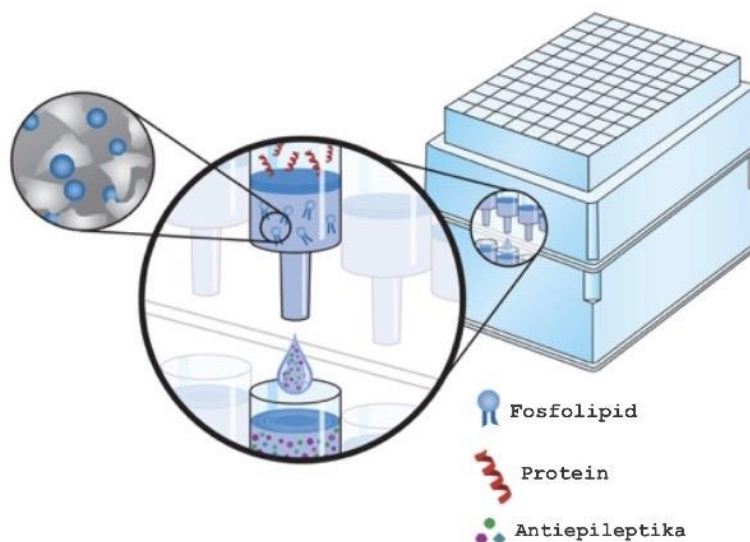
Prøveopparbeidelse er nødvendig for å rense prøven for proteiner, fosfolipider og andre matrikssubstanser. I tillegg er det viktig for å unngå at kolonnen forurenses med bunnfall av proteiner som reagerer med komponenter i mobilfasen og buffersalter (6).

Væske-væske ekstraksjon og fast-fase ekstraksjon er to hyppig brukte ekstraksjonsmetoder for prøveopparbeidelse. Prøveopparbeidelsen som brukes i denne oppgaven er proteinfelling, og kan utføres både med og uten fjerning av fosfolipider. Et fellingsreagens tilsettes og denaturerer proteinene i prøven. Utfelte proteiner samles i bunnen av brønnen, mens de aktuelle analyttene forblir i supernatanten (7,8).

Acetonitril (ACN) og metanol er polare organiske fellingsreagenser som brukes ved proteinfelling. Det kan også benyttes ACN med maursyre (FAc). Dette gir økende elektrostatiske tiltrekking mellom proteinene og fører til proteinaggregering (8).

Prøver med høyt innhold av fosfolipider kan få forsterket matrikseffekt ved analyse på UPLC-MSMS-instrumentet, da fosfolipider reduserer sensitiviteten til massespektrometeret

og levetiden til kolonnen. Proteinfelling med filtrering er en egnet metode for fjerning av fosfolipider og kan utføres ved bruk av filtreringsplater (Ostroplater). Ved hjelp av positivt trykk eller vakuüm blir prøveløsningen presset eller sugd gjennom et filter og ned i en underliggende plate med brønner. Utfelte og denaturerte proteiner blir liggende igjen på oversiden av filteret, mens fosfolipidene binder seg til filteret (figur 2) (9).



Figur 2: Fordeling av komponenter fra prøveløsningen i Ostroplaten og dypbrønnsplaten ved proteinfelling med fjerning av fosfolipider (10).

### 1.3 Omvendt fase-kromatografi: Separasjonsprinsipp for antiepileptika på UPLC-MS/MS

Metoden som benyttes ved separasjon av antiepileptika er omvendt fase-kromatografi. I omvendt fase-kromatografi er mobil fase (MF) polar og stasjonær fase (SF) upolar. MF kan være en blanding av vann og en eller flere organiske løsninger, og pumpes gjennom kolonnen ved hjelp av konstant volum. Dette angis som volum per minutt og påvirker trykket, som vil øke proporsjonalt med volumet (11). Metanol og ACN er eksempler på organiske mobilfaser som brukes i denne typen kromatografi. Forholdet mellom vann og organisk løsning påvirker elueringsstyrken til MF. Ved høyt innhold av metanol i MF i forhold til vann, vil analyttens retensjon i SF svekkes og elueringsstyrken øker (6). I denne metoden består MF av metanol, vann og FAc.

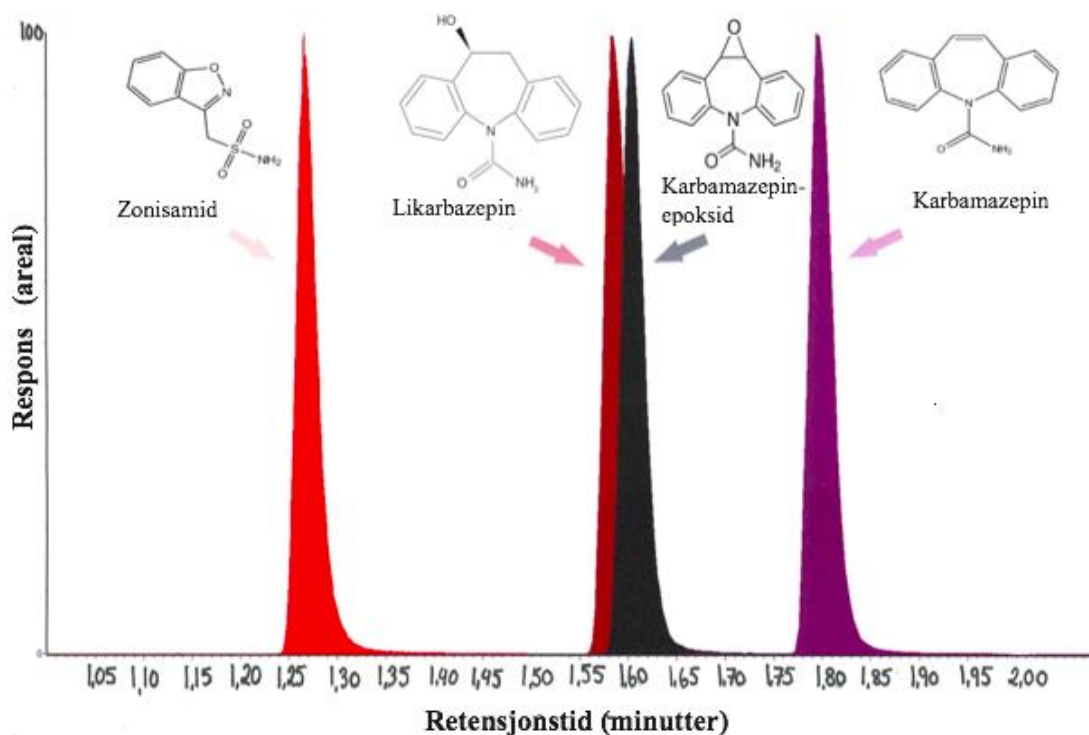
SF består av silikapartikler bundet til hydrokarbonkjeder (C18). Silika er et polart stoff som danner polymere overflatelag (6). Stasjonærfasens upolare egenskaper øker i takt med



lengden på hydrokarbonkjeden (11). Interaksjon mellom SF og analyttene skjer via upolare hydrokarbonkjeder på SF og den hydrofobe delen på analytten. Interaksjonen er svake Van der Waals-bindinger som øker med molekylstørrelsen til antiepileptika (11).

Analyttenes vandringshastighet gjennom kolonnen påvirkes av en likevektsfordeling mellom SF og MF. Vandringshastigheten avhenger av analyttenes kjemiske og fysiske egenskaper, trykk og temperatur, samt diameter og lengde på kolonnen. Tiden det tar fra prøven injiseres til den elueres fra kolonnen angis som retensjonstid (Rt) (11).

Zonisamid er mest polart og elueres først (Rt = 1,26 min), etterfulgt av likarbazepin (Rt = 1,59 min), karbamazepinepoksid (Rt = 1,60 min) og karbamazepin (Rt = 1,80 min) (figur 3).



Figur 3: Kromatografisk separasjon av zonisamid, likarbazepin, karbamazepinepoksid og karbamazepin vist i et kromatogram med hensyn på retensjonstid og areal.

#### 1.4 Deteksjonsprinsipp for UPLC-MSMS

Et massespektrometer benyttes som detektor for kvantifisering av antiepileptika. MS består av hovedkomponentene ionekilde, masseanalysator og detektor. I ionekilden blir molekylene

ionisert og fragmentert i mindre bestanddeler. Molekylmassen bestemmes i en analysator etter forholdet mellom masse og ladning ( $m/z$ ) og detekteres av en detektor (11).

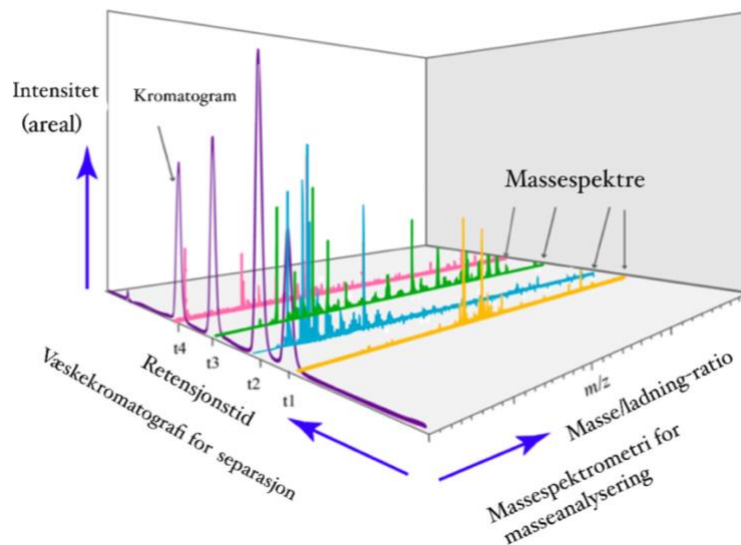
Ionisering av analyttene skjer ved bruk av elektronsprayionisering (ESI). Det finnes ESI+ og ESI-, men denne metoden benytter ESI+ (7). Analyttløsningen pumpes gjennom en nål i et spenningsfelt. På grunn av en elektrisk gradient mellom nålen og mot-elektroden dannes en kjegle med overvekt av positiv ladning på overflaten. Det blir produsert ladede dråper som går mot tuppen av kjeglen, og disse fordampes på vei mot massespektrometeret ved hjelp av nitrogengass. Resultatet av fordampingen er frie, ioniserte analyttmolekyler som analyseres på bakgrunn av deres forhold mellom masse og ladning (12).

Tandem massespektrometri består av to massespektrometere og en kollisjonscelle, samt åtte parallelle sylindriske staver (figur 4). Sistnevnte tilføres en fast likespenning og vekselspanning som varieres slik at ioner med ulik  $m/z$ -ratio slippes gjennom massefilteret en etter en (11). Analyttene gjennomgår to fragmenteringer. Den første fragmenteringen skjer i ionekilden ved atmosfærisk trykk, og genererer moderioner. Den andre fragmenteringen skjer i kollisjonscellen og fører til nedbrytning av moderionene til mindre fragmenter (datterioner) (13). Molekylets struktur og mengde spenningsenergi tilsatt i ionekilden påvirker fragmenteringen (11). Overgangen fra molekyl til ioniserte fragmenter forhåndsinnstilles slik at spesifikke fragmenter tilhørende hver analytt detekteres (14).



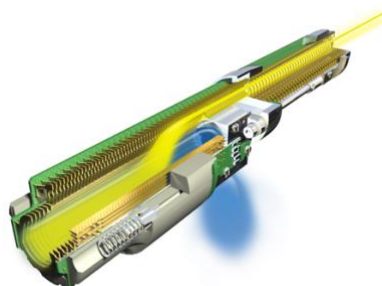
Figur 4: Deteksjon med tandem massespektrometri. I kvadrupol 1 blir ioner selektert i et massefilter. I kollisjonscellen blir ioner fragmentert. I kvadrupol 2 blir fragmenterte ioner selektert i et massefilter og sendt inn en etter en til detektoren som detekterer ioniserte fragmenter som elektriske signal (15).

Ionene detekteres ved hjelp av elektriske signaler som dannes når de kolliderer i detektoren (16). Disse registreres som topper i et kromatogram. I tillegg settes verdiene inn i et massespekter basert på  $m/z$ -ratio og mengde ioner. Toppene i massespekteret er assosiert med hver enkelt topp i kromatogrammet (figur 5) (17).



Figur 5: Kromatogram og massespekter, og hvordan disse er relatert til hverandre (17).

Både Xevo TQ-S og Xevo TQ-XS benytter teknologien StepWave. Versjonen i Xevo TQ-XS er en forbedret utgave av den eldre versjonen. StepWave XS<sup>TM</sup> er en ioneguide som siler ut molekyler som ikke er av interesse for analysen, blant annet gassmolekyler og andre nøytrale komponenter. Fjerning av kontaminanter baner vei for aktiv transport av analyttionene til masseanalysatoren. Teknologien forbedrer metodens robusthet og sensitivitet. Ioneguiden er delt opp i “trappetrinn” der overflødige molekyler fjernes i det første trinnet, og ionestrålen med målanalyttene fokuseres mot masseanalysatoren i det andre trinnet (figur 6) (1,18).



Figur 6: Illustrasjon av StepWave XS<sup>TM</sup> som viser trinn for utsiling og ionestråle-fokusering. Den gule strømmen er ionestrømmen som sendes mot detektoren. Den blå skyen symboliserer andre molekyler som filtreres ut av MS-detektoren (18).

## 1.5 Internstandard, standarder og kontroller

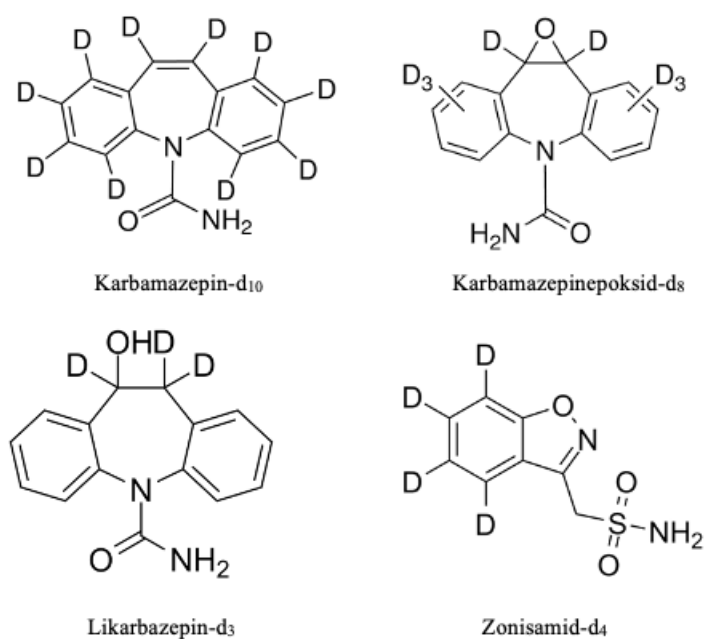
### Internstandard

Internstandard (IS) har kjemiske og fysiske egenskaper som ligner analytten. IS kan måles separat fra analytten, da de ikke er identiske. Prøver, kontroller og standarder blir tilsatt en kjent mengde IS før analysering (19). IS brukes for å korrigere for blant annet tap av analytt ved prøveopparbeidelsen. Ved store avvik i areal korrigerer IS slik at drift mellom prøver i samme analyseoppsett blir minimal (11).

Kriterier som vurderes i valg av IS er at den aktuelle IS ikke må være til stede i prøven, og må separeres fra andre stoffer i prøvematriksen. I tillegg må retensjonstiden til IS være mest mulig lik retensjonstiden til analytten som bestemmes. IS må ikke reagere med SF, MF eller stoffer i prøven, samt oppføre seg som analytten under prøveopparbeidelsen.

Konsentrasjonen som tilsettes av IS gir areal som er mest mulig likt arealet til stoffet som skal bestemmes (11). Konsentrasjonen til serumprøvene som skal analyseres er ikke kjent. IS-konsentrasjonen som velges ligger derfor midt på standardkurven.

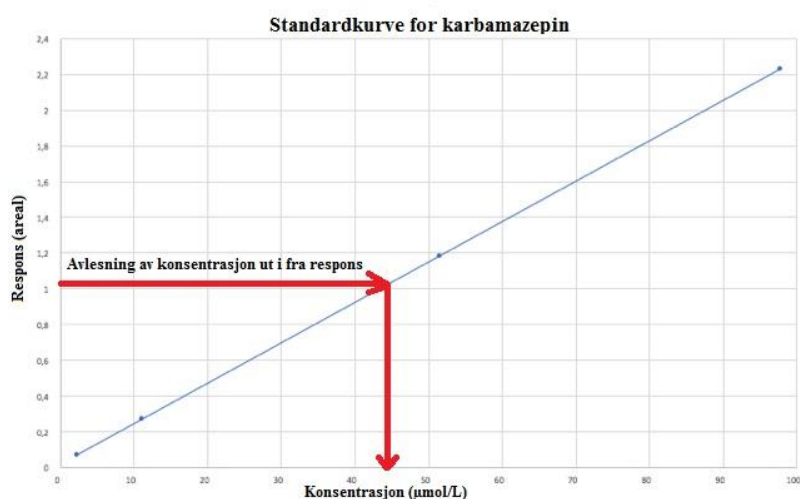
Forskjellen mellom IS og analyttene er at noen hydrogenatomer er erstattet med deuteriumatomer hos IS. For denne metoden benyttes karbamazepin- $d_{10}$ , karbamazepinopoksid- $d_8$ , likarbazepin- $d_3$  og zonisamid- $d_4$  som internstandarder (figur 7).



Figur 7: Molekylstrukturene til karbamazepin- $d_{10}$ , karbamazepinopoksid- $d_8$ , likarbazepin- $d_3$  og zonisamid- $d_4$  (20–23).

## Standarder

En standard er en løsning laget med kjent konsentrasjon. Metoden kalibreres ved å måle konsentrasjonene av fire standarder i bestemte konsentrasjonsintervaller som dekker måleområdene til hvert antiepileptika (24). En blankprøve (standard 0) inkluderes for å få systemet i likevekt. Standardene gjennomgår samme prøveoppbehandling og deteksjon som pasientprøvene. Standardrekken anvendes for å kvantifisere konsentrasjonen av antiepileptika i pasientprøver, som vist i figur 8 (11).



Figur 8: Standardkurve framstilt av standardrekke med fire standarder for analytten karbamazepin. De røde pilene illustrerer prinsippet for avlesning av konsentrasjon basert på respons fra analytten.

Standardkurvene er nødvendige for utregning og vurdering av nedre kvantifiseringsgrense, som er den laveste konsentrasjonen der antiepileptika kan detekteres med en viss grad av sikkerhet (6). Standardkurvene brukes også i bestemmelse av korrelasjonskoeffisienten som et mål på linearitet. Standardkurven bør være tilnærmet lineær, men ikke-lineære standardkurver kan oppstå.

## Kontroller

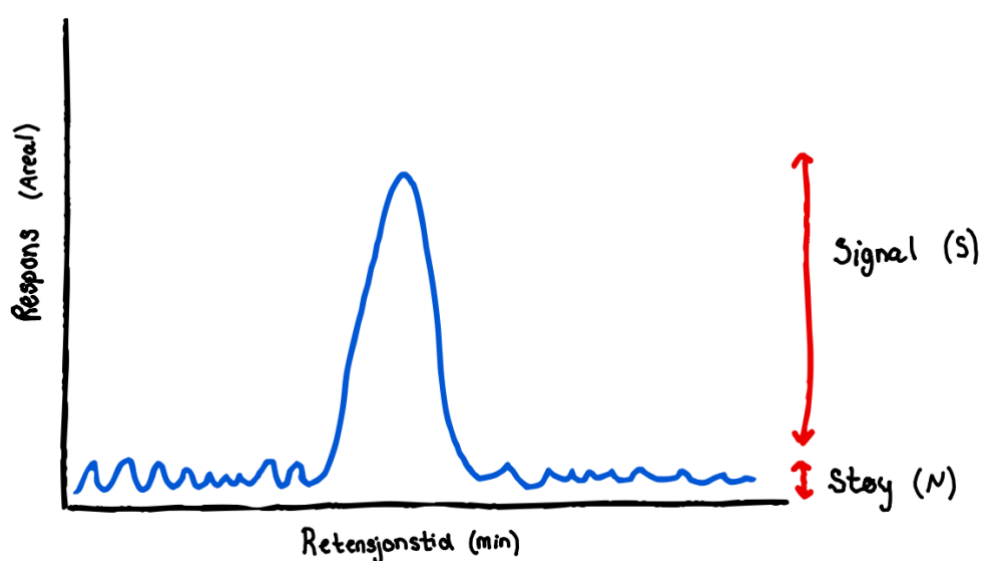
Interne og eksterne kvalitetskontroller benyttes i kvalitetssikring av metoden. Interne kvalitetskontroller har kjente konsentrasjoner av antiepileptika og undersøker om analyseoppsettet kan godkjennes basert på presisjon og riktighet. Eksterne kontroller er sammenlignende laboratorieprøver (SLP) med ukjente konsentrasjoner av antiepileptika. Resultatene sammenlignes med forskjellige laboratorier, og nøyaktigheten bestemmes og vurderes over tid (Jf. avsnitt 1.6.3. s. 11) (19).

## 1.6 Valideringsparametere

### 1.6.1 Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen (LOQ) er den laveste konsentrasjonen av en analytt som kan kvantifiseres med presisjon og nøyaktighet innenfor bestemte krav for metoden. LOQ viser i hvor stor grad bakgrunnsstøy påvirker analyttens konsentrasjon. Standard 1 er standarden med lavest konsentrasjon av analyttene, og egner seg derfor ved undersøkelse av kvantifiseringsgrense (25).

Forholdet mellom høyden på signaltoppen og høyden på toppene forårsaket av bakgrunnsstøy kalles signal til støy (S/N-ratio) (figur 9) (24,26).



Figur 9: Kromatogram med interfererende topper som ansees som støy (N), samt en topp som er signalet (S).

Nedre kvantifiseringsgrense for metoden er fastsatt av laboratoriet og tilsvarer konsentrasjonen til standard 1 for hver analytt. S/N-ratio for standard 1, samt CV (%) og nøyaktighetsavvik (%) beregnes ved formel 1 og 2, og vurderes etter krav.

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \cdot 100\% \quad (\text{formel 1})$$

CV: variasjonskoeffisient

SD: standardavvik

$\bar{X}$ : middelværdi

$$\text{Nøyaktighet (\% avvik)} = \frac{\text{middelverdi} - \text{teoretisk verdi}}{\text{teoretisk verdi}} \cdot 100\% \quad (\text{formel 2})$$

Fastsatte krav for kvantifiseringsgrense (24):

Standard 1 er lik LOQ;  $S/N \geq 30$  for kvantifiseringsionet

Standard 1:  $CV < 20,0 \%$ , og nøyaktighetsavvik mindre enn  $\pm 20,0 \%$ .

### 1.6.2 Standardkurvens linearitet

Linearitet viser sammenhengen mellom målte og forventede verdier i det analytiske måleområdet (19). Standardkurvens linearitet vurderes ved hjelp av korrelasjonskoeffisienten ( $R$ ), der  $R \geq 0,985$  er det anbefalte akseptkriteriet, og gjelder ved lineær kurvetilpasning (24).

En ekstra standardløsning med 200% av konsentrasjonen til den høyeste standarden inkluderes også i analyseoppsettet. Denne kalles høy standard og viser hvordan standardkurvens forløp fortsetter utenfor måleområdet. Lineariteten til standardkurver med høy standard vurderes i forhold til  $R$  fra lineær kurvetilpasning og visuelt ved kvadratisk standardkurve (24).

### 1.6.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarhet er en parameter for metoden sin presisjon og viser variasjon mellom analyseserier fra dag til dag. Dette muliggjør vurdering av samsvar mellom resultater målt under ulike betingelser, som ulike operatører, variasjon i utstyr og analysetidspunkt (27). Reproduserbarhet uttrykkes som middelverdi og  $CV$  (%) for hvert konsentrasjonsnivå i analyseserien (24).  $CV$  beregnes ved bruk av formel 1.

Nøyaktighet er en kvalitativ parameter som avhenger av metodens riktighet og presisjon. Vurdering av nøyaktighet viser samsvaret mellom målt verdi og sann verdi, og angis i prosent (28). Nøyaktigheten beregnes ved å bruke reproduserbarhetsdata ved innsetting i formel 2. Dette sammenlignes med fastsatt krav (24).

Fastsatt krav for reproduserbarhet:  $CV \leq 15,0 \%$

Fastsatt krav for nøyaktighet: Prosent avvik fra teoretisk verdi  $\leq 15,0 \%$

Nøyaktigheten til metoden vurderes også gjennom deltakelse i et SLP-program. Laboratoriet får tilsendt SLP-er med ukjent verdi. Resultatene blir sammenlignet med resultater fra andre laboratorier som deltar i samme program. Z-verdien beregnes ved innsetting i formel 3 (24).

$$Z = \frac{(\text{målt verdi på ny metode}) - (\text{assigned value})}{SDPA} \quad (\text{formel 3})$$

Assigned value: tildelt verdi

SDPA: standardavvik for kvalitetstesting

SLP-verdiene føres i kontrollkort og vurderes over lengre tid. Ved å anvende Z-verdien kan øvre og nedre grenseverdier på kontrollkortet beregnes, og resultatet blir vurdert i henhold til disse. Avvik registreres dersom Z-verdien havner utenfor  $Z \pm 3$ , samt dersom to påfølgende resultater havner utenfor  $Z \pm 2$ . I slike tilfeller må korrigerende tiltak utføres (29).

Fastsatt krav  $|Z| \leq 2$

#### 1.6.4 Matrikseffekt

Matrikseffekt (ME) er interferens i analysen som skyldes andre komponenter i prøven enn målanalyttene (30). Prøvens matriks inneholder komponenter som øker eller reduserer intensiteten til signalet ved å endre ioniseringen av analyttene (31). Partikler fra prøvematriksen kan ha tilnærmet lik retensjonstid som analytten. I tillegg kan påvirkning av fordampingsprosessen under elektronsprayioniseringen gi avvikende svar (6). Signalet (arealet) er proporsjonalt med konsentrasjonen og gir konsentrasjoner med negativt eller positivt avvik. IS kan korrigere for slike avvik (30). ME og ME-korrigert beregnes ved bruk av formel 4 og 5 (24).

$$ME = \frac{\text{Intensitet}_{\text{matriks prøve}}}{\text{Intensitet}_{\text{DIR løsning}}} \cdot 100\% \quad (\text{formel 4})$$

$$ME = \frac{\left( \frac{\text{Intensitet}_{\text{matriks prøve}}}{\text{IS-Intensitet}_{\text{matriks prøve}}} \right)}{\left( \frac{\text{Intensitet}_{\text{DIR løsning}}}{\text{IS-Intensitet}_{\text{DIR løsning}}} \right)} \cdot 100\% \quad (\text{formel 5})$$

ME: matrikseffekt

ME-IS: matrikseffekt korrigert med internstandard

DIR: direkteløsning



Akseptkriterier for ME korrigert med IS: 75 - 125 %

Presisjonskrav for ME:  $CV \leq 15,0 \%$

### 1.6.5 Robusthet

Robusthet er et mål på metodens kapasitet til å ikke bli påvirket av små variasjoner i metodeparametrene. Dette gir indikasjon på metodens pålitelighet (6). Drift er en av flere måter å måle robusthet, og blir vurdert med hensyn til intensiteten (areal) til antiepileptika i en kontroll tilsatt internstandard. Ved å injisere kvalitetskontrollene først og sist i analyseserien, kan den prosentvise forskjellen på kontrollkonsentrasjonen og arealet beregnes. Resultatet viser hvor mye driften påvirkes av et visst antall prøver. Dette beregnes ved innsetting i formel 6 (24).

$$\text{Avvik (\%)} = \frac{X_2 - X_1}{X_1} \cdot 100\% \quad (\text{formel 6})$$

### 1.6.6 IS – recovery

IS-recovery angir drift i areal for IS i forhold til middelveien av IS-areale til standardrekken. Dette sammenlignes med pasientprøver og kontroller. Resultatet må være innenfor fastsatte grenser før prøvesvaret gis ut. Ved å undersøke IS-recovery kan variasjon og eventuelle avvik i internstandardens areal vurderes. Resultatet gir et bilde på hva som er normal IS-recovery for analyttene (24). Beregning av maksimums- og minimumsverdi av resultatene fra IS-recovery brukes videre i prosesseringsmetoder. Verdier litt høyere og lavere enn maksimum- og minimumsverdien legges inn for metoden. Avvik over dette oppdages og flagges ved senere prosessering av resultatene.

### 1.6.7 Samkjøring mellom detektorene

Ved å sammenligne prøvesvar analysert på de to MS-detektorene, kan den nye MS-detektoren vurderes i forhold til den gamle. Dette muliggjør påvisning av systematiske avvik fra normal funksjon mellom de to detektorene. Avvik mellom resultater fra samme prøver analysert med Xevo TQ-S og Xevo TQ-XS beregnes ved innsetting i formel 7.

$$\text{Avvik (\%)} = \frac{X_1 - X_2}{\left(\frac{X_1 + X_2}{2}\right)} \cdot 100\% \quad (\text{formel 7})$$

## 1.7 Problemstillinger

Målet med oppgaven er å validere metode for kvantifisering av antiepileptika i serum ved bruk av ny detektor, Xevo TQ-XS, på UPLC-MSMS. Prøveresultatene for antiepileptika (karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid) skal sammenlignes med detektoren Xevo TQ-S.

Følgende problemstillinger skal undersøkes:

- Vil forholdet signal/støy (S/N-ratio), CV og nøyaktighet for karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid oppfylle kravene på henholdsvis  $\geq 30$ ,  $< 20,0\%$  og  $< \pm 20,0\%$  ved vurdering av nedre kvantifiseringsgrense?
- Hvordan er den lineære sammenhengen mellom beregnet og målt konsentrasjon i måleområdene for karbamazepin (2,5 – 100  $\mu\text{mol/L}$ ), karbamazepinepoksid (0,25 – 20  $\mu\text{mol/L}$ ), likarbazepin (2,5 – 200  $\mu\text{mol/L}$ ) og zonisamid (5,0 – 250  $\mu\text{mol/L}$ )?
- Vil reproduserbarheten mellom kontrollseriene av antiepileptika ha  $\text{CV} \leq 15,0\%$ ?
- Vil nøyaktigheten til metoden oppfylle kravet på  $\leq 15,0\%$ , og vil Z-verdien for SLP-ene innfri kravet på  $\leq 2$ ?
- I hvor stor grad påvirker matrikseffekt deteksjon av antiepileptika, og vil matriksverdiene være innenfor kravet på 75 – 125%?
- Hva er avviket for driftskontrollen og hva sier dette om robustheten til metoden?
- Hva er normal IS-recovery for karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid?
- Hva forteller Passing and Bablok regresjonsanalyse om sammenhengen mellom resultater fra Xevo TQ-XS og Xevo TQ-S?

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Prøvemateriale

Internstandarder, standarder og kontroller brukt under utførelsen med tilhørende konsentrasjoner, er plassert i tabell 1, 2 og 3.

Tabell 1: Antiepileptika med tilhørende internstandarder og konsentrasjoner.

Antiepileptika	Internstandard	Konsentrasjon IS ( $\mu\text{mol/L}$ )
Karbamazepin	Karbamazepin-d <sub>10</sub>	10
Karbamazepinepoksid	Karbamazepinepoksid-d <sub>8</sub>	10
Likarbazepin	Likarbazepin-d <sub>3</sub>	15
Zonisamid	Zonisamid-d <sub>4</sub>	25

IS: internstandard

Tabell 2: Konsentrasjoner til antiepileptika-kontroller.

Kontroller	Antiepileptika ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	Karbamazepin	Karbamazepinepoksid	Likarbazepin	Zonisamid
QC 1	5,0	0,5	5,0	8,0
QC 2	40	4,0	40	80
QC 3	80	15	150	200

QC: kvalitetskontroll

Tabell 3: Konsentrasjoner til antiepileptika-standarder.

Antiepileptika	Standarder ( $\mu\text{mol/L}$ )			
	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4
Karbamazepin	2,5	10	50	100
Karbamazepinepoksid	0,25	1,0	5,0	20
Likarbazepin	2,5	10	50	200
Zonisamid	5,0	20	100	250

Std: standard

Standard 0 ble også benyttet i standardrekken under utførelsen, og ble analysert fire ganger før standard 1 og en gang etter standard 4, samt etter høy standard (Jf. avsnitt 1.6.2 s. 10).

Prøvematerialet var 110 anonymiserte serumprøver fra pasienter som behandles med antiepileptika, og SLP-er for karbamazepin (17 SLP-er), karbamazepinepoksid (17 SLP-er), likarbazepin (10 SLP-er) og zonisamid (10 SLP-er).

## 2.2 Reagenser og utstyr

Reagenser benyttet i utførelsen for validering av Xevo TQ-XS for kvantifisering av antiepileptika er listet i tabell 4.

Tabell 4: Reagenser benyttet til utførelse for validering av Xevo TQ-XS.

Reagenser	Bruksområde
ACN med 1% FAc	Prøveopparbeidelse
0,1 % FAc	Mobilfase i UPLC-MSMS
MeOH	Mobilfase i UPLC-MSMS
20% MeOH fortynnet i vann	Utførelse av matrikseffekt

ACN: acetonitril, FAc: maursyre, MeOH: metanol

Utstyr nødvendig for prøveopparbeidelse og analysering av antiepileptika på UPLC-MSMS er listet i tabell 5 og 6.

Tabell 5: Utstyr, produkt og produsent benyttet for utførelse av prøveopparbeidelse.

Utstyr til prøveopparbeidelse	Produkt	Produsent
96-brønns filtreringsplate	Ostro™ 96 Well Plate, 25 mg (Ostroplate)	Waters
96-dypbrønnsplate	Square Well Collection Plate, 2 mL	Waters
Pipetteringsrobot	Hamilton ML Star	Hamilton Robotics AB
Reagenskar til Hamilton	300 mL kar	Hamilton Robotics AB
Positive pressure processor for filtrering	Positive pressure 96-processor	Waters
Forseglingsmatte for 96-dypbrønnsplate	Cap-mat square plugs	Waters

Tabell 6: Utstyr til UPLC-MSMS-instrument.

Utstyr til UPLC-MSMS	Produkt	Spesifikasjoner	Produsent
Forkolonne	ACQUITY UPLC® HSS T3 Van Guard™	1,8 µm 2,1 x 5 mm	Waters
Analytisk kolonne	ACQUITY UPLC® HSS T3	1,8 µm 2,1 x 100 mm	Waters
MSMS-detektorer	Xevo TQ-S Xevo TQ-XS	Gammel versjon Ny versjon	Waters
Software til UPLC-MSMS	MassLynx	Versjon 4.2	Waters
Software for resultatbehandling	TargetLynx	Versjon 4.2	Waters

### 2.3 Fremgangsmåte for prøveopparbeidelse

Første steg for prøveopparbeidelse innebar bruk av Ostro™ 96-brønnsplate og ACN med 1% FAc som fellingsreagens for proteinfelling. Standardrekken med fire standarder, standard blank, tre kontroller og serumprøver ble blandet ved hjelp av virvelmikser. Disse ble plassert på pipetteringsroboten Hamilton ML Star på angitte plasser spesifisert på flytskjemaet for bestemmelse av antiepileptika i serum (vedlegg 1). Kjølig fellingsreagens ble tilsatt. Pipettering av prøvemateriale, internstandard, standardrekke, kontroller og fellingsreagens til Ostroplaten ble utført automatisk på Hamilton. Pipetteringsroboten ble styrt ved hjelp av dataprogrammet Hamilton VENUS Software (32).

Det andre steget for prøveopparbeidelse innebar bruk av positive pressure 96-processor (PPP). Etter pipettering på Hamilton ble Ostroplaten satt oppå en dypbrønnsplate. Ostroplaten og dypbrønnsplaten ble plassert på PPP-modulen (figur 10). Trykket ble økt til 4-6 psi i 2 minutter. Trykket ble ytterligere økt med 2 psi i 1 minutt, og prøveblandingen ble filtrert ned i dypbrønnsplaten. Ostroplaten og dypbrønnsplaten ble tatt av PPP og separert fra hverandre. En forseglingsmatte ble plassert over brønnene i dypbrønnsplaten som inneholdt prøveløsning (7).



Figur 10: Ostroplate og dyprønnsplate plassert på PPP-modulen (33).

#### 2.4 Fremgangsmåte for deteksjon av antiepileptika

Dyprønnsplaten med ferdig pipeterte og filtrerte prøveløsninger ble plassert på en ledig hylle i UPLC-MSMS-instrumentet. Barkoder tilhørende prøveoppsettet ble overført fra Hamilton til instrumentsoftwaren MassLynx som en .csv-fil. Nødvendige maler og informasjon for analysering ble hentet opp fra datasystemet ved å følge flytskjemaet for analyse på LC-MSMS (34).

Analysebetingelser for deteksjon av antiepileptika på UPLC-MSMS er listet i tabell 7.

Tabell 7: Analysebetingelser for deteksjon av antiepileptika.

Analysebetingelser	
Injeksjonsvolum	0,5 $\mu$ mol/L
Temperatur kolonne	50°C
Temperatur autosampler	10°C
Vasking før injisering	2,0 sekunder
Vasking etter injisering	6,0 sekunder
Flow mobilfase	0,6 ml/min

Overganger fra moderioner til datterioner for analyttene må være kjent for å kunne detektere riktige fragmenter. Disse er presentert i tabell 8.

Tabell 8: Overganger for antiepileptika og tilhørende internstandarder.

Antiepileptika	Overganger (m/z)
Karbamazepin	237,1 > 179,2
Karbamazepinepoksid	253,1 > 180,1
Likarbazepin	255,4 > 194,1
Zonisamid	213,1 > 132,0
Internstandard	
Karbamazepin-d <sub>10</sub>	247,3 > 204,1
Karbamazepinepoksid-d <sub>8</sub>	261,3 > 188,1
Likarbazepin-d <sub>3</sub>	258,3 > 197,1
Zonisamid-d <sub>4</sub>	217,1 > 136,0

## 2.5 Undersøkelse av valideringsparametere

### 2.5.1 Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen ble undersøkt ved å vurdere S/N-ratio for tre analysesekvenser analysert over tre dager. Nedre kvantifiseringsgrense var allerede fastsatt av laboratoriet, men ble undersøkt ved validering av Xevo TQ-XS for å sjekke om målt verdi ble lik fastsatt verdi (% avvik). Forholdet mellom støy og analyttens signal ble hentet ut ved å bruke kromatogrammet til standard 1 i MassLynx. *Signal to Noise* under fanen *Process* ble valgt, samt innstillingen *Peak to peak*. Feltene *Signal* og *Noise* ble fylt ut ved å trekke linjer i området før og over toppen i kromatogrammet. S/N-ratio ble rapportert direkte i S/N-ratio-kromatogrammet. CV (%) og avvik (%) for arealet til standard 1 over tre dager ble beregnet ved innsetting i formel 1 og 2.

### 2.5.2 Standardkurve

Fire konsentrasjoner av standardløsningen ble analysert med Xevo TQ-XS. I tillegg ble en høy standard inkludert i analyserekken for vurdering av standardkurvens videre forløp etter måleområdet. Den høye standarden ble analysert i standardrekken etter standard 4.

Kvadratisk standardkurve for standardrekken og høy standard ble hentet ut direkte fra TargetLynx.

Lineær og kvadratisk standardkurve framstilt i TargetLynx ble vurdert for hver analytt i serier over tre dager. Høy standard ble bare analysert på dag en. Korrelasjonskoeffisienten R ble hentet ut ved hjelp av lineær kurvetilpasning og vurdert i forhold til anbefalt krav ( $R \geq 0,985$ ).

### 2.5.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarheten til metoden ble undersøkt ved å analysere kontroller på tre nivåer i serier over tre dager. Middelerdi og CV (%) ble beregnet ved innsetting i formel 1, og uttrykker reproduserbarheten. Vurdering av nøyaktighet ble utført ved beregning av prosentvis avvik mellom teoretisk verdi og middelerdi til kontroller i tre nivåer analysert over tre dager. Dette ble beregnet ved bruk av formel 2.

Det ble analysert minst 10 SLP-er per analytt og nøyaktighet ble vurdert ved å beregne Z-verdien ved innsetting i formel 3. SDPA, tildelt verdi og tillaget verdi (spiket verdi) for hver analytt ble avlest i tabell fra leverandør, og brukt ved utregning av Z-verdi.

### 2.5.4 Matrikseffekt

Matrikseffekt ble undersøkt ved å bruke seks matriksprøver for laveste kvalitetskontroll (QC1), og seks matriksprøver for høyeste kvalitetskontroll (QC3). Dette ble satt på Hamilton for pipettering i Ostroplate. 20% MeOH (25  $\mu$ L) i vann ble brukt istedenfor internstandard. Prøvene ble filtrert ved proteinfelling på PPP-modulen. All pipettering etter PPP ble utført i avtrekksskap. Eluat (200  $\mu$ L) fra hver matriksprøve ble pipettert over i tomme brønner på dypbrønnsplaten og tilsatt analyttløsning (10  $\mu$ L). Analyttløsningene var QC1- og QC3-løsninger laget til utførelse av matrikseffekt. Analyttløsningene gjennomgikk en annen type prøveopparbeidelse enn matriksprøvene, men ble lagd slik at de hadde tilnærmet likt signal. Alle brønnene med eluat (200  $\mu$ L) og analyttløsning (10  $\mu$ L) ble tilsatt internstandard (10  $\mu$ L).

Det ble laget direkteløsning (DIR-løsning) for QC1 og QC3 ved å blande fellingsreagens (ACN m/ 1% FAc, 200  $\mu$ L) med analyttløsning (10  $\mu$ L) og internstandard (10  $\mu$ L). Dette ble pipettert ned i tomme brønner på dypbrønnsplaten.



Dypbrønnsplaten med matriksprøvene og DIR-løsningene ble satt på UPLC-MSMS-instrumentet for deteksjon av antiepileptika. CV og matrikseffekt ble beregnet ved å bruke gjennomsnittsarealet til alle matriksprøvene og DIR-løsningene ved innsetting i formel 4. Ratio mellom analytt- og IS-areal ble beregnet for å kompensere med internstandard, ved innsetting i formel 5.

#### 2.5.5 Robusthet

Vurdering av robusthet ble utført ved å analysere QC2 først og sist (QC2-drift) i analyserekken i serier over tre dager. Robusthet ble beregnet som forskjell mellom de to QC2-verdiene for alle dagene ved innsetting i formel 6. I tillegg ble %-avvik mellom areal til QC2 og QC2-drift beregnet ved bruk av samme formel.

#### 2.5.6 IS-recovery

Internstandard for hver analytt ble tatt med i analyseserien og analysert i serier over tre dager. Variasjon i IS-areal i forhold til standardrekkens gjennomsnittsareal ble beregnet som avvik (%) og rapportert direkte i TargetLynx. Maksimumsverdi og minimumsverdi for alle verdiene ble beregnet ved å bruke formel for dette i Excel.

#### 2.5.7 Samkjøring mellom detektorene

Til samkjøring var det nødvendig med minst 30 pasient- og SLP-prøver til sammen per analytt. Disse ble analysert over tre dager. Prosent avvik mellom resultater fra samme prøver analysert med Xevo TQ-XS og Xevo TQ-S ble beregnet ved innsetting i formel 7. I tillegg ble det utført regresjonsanalyse (Passing and Bablok) på resultatene.

## 3 Resultater og diskusjon

### 3.1 Kvantifiseringsgrense

#### Signal/støy-ratio

Kvantifiseringsgrensen ble undersøkt for å vurdere forholdet mellom signal og støy. S/N-ratio ble beregnet ved hjelp av kromatogrammet til standard 1 for hvert antiepileptika. Resultater for samtlige antiepileptika er presentert i tabell 9 og fullstendig beregningstabell, samt kromatogram i vedlegg 2.

Tabell 9: Bestemmelse av S/N-ratio ved vurdering av kvantifiseringsgrense.

Dag	Antiepileptika			
	Karbamazepin	Karbamazepinepoksid	Likarbazepin	Zonisamid
	S/N	S/N	S/N	S/N
1	4776	2563	4873	10744
2	2230	1936	2576	3324
3	2792	2901	4844	4942

S/N: støy/signal

S/N-ratio for standard 1 til samtlige antiepileptika tilfredsstiller kravet på  $S/N \geq 30$ . Visuell vurdering av kromatogrammene viser ingen interfererende topper. Alle fire antiepileptika har relativt høy S/N-ratio. Dess høyere S/N-ratio, desto bedre er signalet og det er minimalt med støy i kromatogrammet som påvirker deteksjonen.

#### Presisjon og nøyaktighet

For å undersøke nøyaktighet og presisjon til laveste kvantifiserbare konsentrasjon ble CV og nøyaktighet for standard 1 beregnet. Resultatene presenteres i tabell 10 og vedlegg 2.

Tabell 10: Bestemmelse av presisjon uttrykt som CV og nøyaktighet ved kvantifiseringsgrensen for antiepileptika.

Antiepileptika	N	CV (%)	Nøyaktighet (%avvik)
Karbamazepin	3	2,4	-2,7
Karbamazepinepoksid	3	0,0	-0,0
Likarbazepin	3	2,3	-1,3
Zonisamid	3	1,2	-1,3

N = antall paralleller

Eksempel på beregning av CV og avvik for karbamazepinepoksid ved bruk av formel 1 og 2:

$$CV (\%) = \frac{0,0}{0,25 \mu M} \cdot 100\% = 0,0\%$$

$$Avvik (\%) = \frac{0,25 \mu M - 0,25 \mu M}{0,25 \mu M} \cdot 100\% = 0,0\%$$

Samtlige antiepileptika tilfredsstillt kravet for CV < 20,0% og nøyaktighetskravet < ± 20,0% ved nedre kvantifiseringsgrense. Xevo TQ-XS viser god presisjon og nøyaktighet for deteksjon av disse antiepileptika, og det er samsvar mellom målte og teoretiske verdier.

S/N-ratio, nøyaktighet og presisjon til standard 1 er innenfor kravene til metoden. Det er derfor ikke nødvendig å innføre ny kvantifiseringsgrense for antiepileptika.

### 3.2 Standardkurvens linearitet

#### Standardkurver

For å undersøke lineariteten ble korrelasjonskoeffisientene for hvert antiepileptika bestemt. Verdiene ble hentet ut ved bruk av lineær kurvetilpasning for standardkurvene. Lineariteten ble undersøkt visuelt ved bruk av kvadratisk kurvetilpasning. Resultatene er presentert i tabell 11. Standardkurver og beregningstabeller ses i vedlegg 3.

Tabell 11: Bestemmelse av lineariteten uttrykt i korrelasjonskoeffisient til karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid.

Antiepileptika	Måleområde (µmol/L)	Dag	R
Karbamazepin	2,5 - 100	1	0,9981
		2	0,9985
		3	0,9992
Karbamazepinepoksid	0,25 - 20	1	0,9999
		2	0,9998
		3	0,9996
Likarbazepin	2,5 - 200	1	0,9997
		2	0,9999
		3	0,9999
Zonisamid	5,0 - 250	1	0,9998
		2	0,9999
		3	0,9999

R: korrelasjonskoeffisient

Korrelasjonskoeffisientene for alle fire antiepileptika innfrir det anbefalte kravet ( $R \geq 0,985$ ). Kvadratiske standardkurver for samtlige antiepileptika viser minimalt med krumning.

Det er god lineær sammenheng mellom målte og forventede verdier for hvert antiepileptika.

Prøver innenfor analyttenes måleområder detekteres derfor med god nøyaktighet.

Prøveresultatene er pålitelige, og det er ikke nødvendig å etablere nytt måleområde.

### Standardkurver med høy standard

Standardkurver med høy standard (200% av høyeste standard) ble undersøkt den første dagen for å vurdere lineariteten over måleområdet. Vurdering av lineariteten ble basert på kvadratisk og lineær kurvetilpasning av standardkurvene for analyttene, og kan ses i vedlegg 3 og tabell 12.

*Tabell 12: Korrelasjonskoeffisienter for antiepileptika ved bruk av høy standard i standardrekken.*

Antiepileptika	R for standardkurve med høy standard
Karbamazepin	0,9981
Karbamazepinepoxid	0,9999
Likarbazepin	0,9997
Zonisamid	0,9998

R: korrelasjonskoeffisient

R for karbamazepin, karbamazepinepoxid, likarbazepin og zonisamid innfrir kravet ( $R \geq 0,985$ ) for standardkurver med høy standard inkludert. Det er lineær sammenheng mellom målte og beregnede verdier over standardkurvens måleområde. Kvadratiske standardkurver for alle antiepileptika viser ingen betydelige krumninger etter aktuelle måleområder med høy standard inkludert. Dette indikerer at lineariteten ikke endres betydelig med konsentrasjoner over det fastsatte måleområdet.

### 3.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarhet og nøyaktighet for alle fire antiepileptika ble undersøkt for å vurdere hvordan metoden varierer fra dag til dag. Resultatene er presentert for hver analytt i tabell 13 og som fullstendig beregningstabell i vedlegg 4.

Tabell 13: Bestemmelse av reproduserbarhet og nøyaktighet for karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid.

<b>Karbamazepin</b>	<b>QC1 5 µmol/L</b>	<b>QC2 40 µmol/L</b>	<b>QC3 80 µmol/L</b>
CV (%)	2,0	2,0	0,6
Nøyaktighet (% avvik)	2,0	2,4	0,7
<b>Karbamazepinepoksid</b>	<b>QC1 1 µmol/L</b>	<b>QC2 4 µmol/L</b>	<b>QC3 15 µmol/L</b>
CV (%)	0,0	1,4	2,0
Nøyaktighet (% avvik)	0,0	0,8	-1,3
<b>Likarbazepin</b>	<b>QC1 5 µmol/L</b>	<b>QC2 40 µmol/L</b>	<b>QC3 150 µmol/L</b>
CV (%)	1,2	2,4	0,8
Nøyaktighet (% avvik)	-0,7	4,2	2,0
<b>Zonisamid</b>	<b>QC1 8 µmol/L</b>	<b>QC2 80 µmol/L</b>	<b>QC3 200 µmol/L</b>
CV (%)	1,5	2,7	1,8
Nøyaktighet (% avvik)	-0,8	1,9	-1,2

CV: variasjonskoeffisienten, QC: kvalitetskontroll

Eksempel på beregning av CV (%) og nøyaktighet for kontroll 1 karbamazepin ved bruk av henholdsvis formel 1 og 2:

$$CV (\%) = \frac{0,10 \mu M}{5,1 \mu M} \cdot 100\% = 2,0 \%$$

$$Nøyaktighet (\% \text{ avvik}) = \frac{5,2 \mu M - 5 \mu M}{5 \mu M} \cdot 100\% = 2,0 \%$$

### Reproduserbarhet

Samtlige antiepileptika tilfredsstillt kravet for reproduserbarhet på  $CV \leq 15,0 \%$ . Det er overensstemmelse mellom resultater analysert på ulike dager, og reproduserbarheten til metoden er god. Variasjoner fra dag til dag gir ikke betydelige utslag for resultatene.

### Nøyaktighet

Alle fire antiepileptika innfrir kravet for nøyaktighet (prosent avvik fra teoretisk verdi  $\leq 15,0 \%$ ). Xevo TQ-XS viser god presisjon og riktighet for deteksjon av antiepileptika. Analyttene detekteres med høy grad av nøyaktighet og pålitelighet, og det er samsvar mellom målt og sann verdi for kontrollene i analyseoppsettet. Tilfredsstillende nøyaktighet tyder på fravær av signifikante systematiske og tilfeldige feil.

## Nøyaktighet vurdert ved SLP

Analysering av SLP-er ble vurdert med hensyn til nøyaktighet. Dette ble brukt for beregning av Z-verdier til SLP-er for hvert antiepileptika. Resultatene er presentert i tabell 14 og som fullstendige beregningstabeller i vedlegg 5.

Tabell 14: Z-verdier fra analysering av SLP-er sortert etter analyseringsdag.

Antiepileptika	Z-verdi		
	Dag 1	Dag 2	Dag 3
Karbamazepin	0,1	-0,2	-0,5
	0,1	-0,1	-0,4
	1,6	0,1	0,0
		-0,1	-0,1
		0,0	-0,2
		-0,1	-0,2
			-0,1
			-0,3
Karbamazepinepoksid	0,2	-2,2	-1,1
	-0,2	-0,6	-0,5
	-2,4	0,3	-0,3
		0,1	-2,0
		-1,7	-1,8
		-2,2	-2,9
			-2,9
			-2,9
Likarbazepin	0,0	0,2	-0,3
	-0,1	-0,1	0,2
		0,1	0,0
		0,1	
		-0,2	
Zonisamid	-0,9	-1,4	-1,2
	-0,8	-1,5	-1,2
	1,4	-1,0	-1,3
	-1,0		

Røde felt er verdier utenfor kravet.

Eksempel på beregning av Z-verdi for karbamazepin ved bruk av formel 3:

$$Z = \frac{16,7 \mu M - 16,50 \mu M}{1,764} = 0,1$$

Z-verdiene for karbamazepin, likarbazepin og zonisamid innfrir kravet på  $\leq 2$ . Det er god nøyaktighet for deteksjon av disse antiepileptika.

Karbamazepinepoksid har Z-verdier som ikke tilfredsstillt kravet. Den første dagen var en av tre Z-verdier  $> 2$ . På dag to gjaldt dette to av seks Z-verdier. Dag tre hadde fire av åtte Z-

verdier som ikke innfridde kravet, der en av SLP-ene var reanalyse av en SLP fra dag en. SLP-ene har tidligere innfridd kravet og avvikene kan tyde på dårlig holdbarhet for karbamazepinepoksid i SLP-ene eller i standardrekken. Siden dette kun gjelder karbamazepinepoksid, tyder det på at analytten er mer ustabil enn de andre analyttene.

En mulig årsak til avvikende Z-verdier er tap av analytt i SLP-ene forårsaket av gjentatte tining og frysinger. I tillegg kan det skyldes manglende sensitivitet for karbamazepinepoksid hos Xevo TQ-XS. For å sjekke om avvikene fra dag tre kan knyttes til SLP-ene eller Xevo TQ-XS, ble Z-verdier beregnet for de samme SLP-ene etter deteksjon på Xevo TQ-S (vedlegg 5). Xevo TQ-S ga Z-verdier over kravet hos fire av åtte SLP-er, mens Xevo TQ-XS ga Z-verdier over kravet på fem av åtte SLP-er. Dette øker sannsynligheten for at feilen kan knyttes til SLP-ene eller standardrekken. Avvik mellom detektorene for de aktuelle SLP-ene er alle under 15,0% (vedlegg 9), og støtter påstanden om at de avvikende verdiene skyldes ustabilitet for karbamazepinepoksid i SLP-ene.

Videre undersøkelser må utføres før detektoren kan godkjennes for dette antiepileptika, da avvikene kan gi problemer ved deteksjon på begge detektorene. For å undersøke om avvikene er knyttet til holdbarhet, ble det bestilt nye SLP-er. Planen var å analysere disse og sammenligne med tidligere SLP-verdier. Leveringsforsinkelser og tekniske problemer med instrumentet som benytter Xevo TQ-XS, gjorde at dette ikke lot seg gjennomføre.

### 3.4 Matrikseffekter

Matrikseffekt ble undersøkt for å vurdere hvordan og i hvilken grad andre komponenter i prøvematriksen påvirker deteksjon av antiepileptika. Matriksprøver ble sammenlignet med DIR-løsninger. Resultatene er presentert i tabell 15 og som fullstendig tabell i vedlegg 6.

Tabell 15: Bestemmelse av matrikseffekt ved deteksjon av antiepileptika på Xevo TQ-XS.

Antiepileptika	Kontroll (µmol/L)	ME (%)	ME-korrigert (%)
Karbamazepin	QC1 5,0	89	100
	QC3 80	101	103
Karbamazepinepoksid	QC1 0,5	83	99
	QC3 15	102	103
Likarbazepin	QC1 5,0	81	99
	QC3 150	98	103
Zonisamid	QC1 8,0	108	102
	QC3 200	98	103

ME: matrikseffekt, QC: kvalitetskontroll, ME-korrigert: matrikseffekt korrigert med internstandard

Eksempel på beregning av ME og ME-korrigert for QC1 karbamazepin ved bruk av formel 4 og 5:

$$ME = \frac{160183}{142916} \cdot 100\% = 89\%$$

$$ME - korrigert = \frac{\left(\frac{160183}{1627012}\right)}{\left(\frac{142916}{1829624}\right)} \cdot 100\% = 100\%$$

ME og ME-korrigert for karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid er innenfor kravet på 75 – 125%.

Deteksjon av antiepileptika på Xevo TQ-XS påvirkes i liten grad av matrikssubstanser. Dess nærmere 100% resultatene kommer, desto mindre er matrikseffekten, der en verdi på 100% indikerer ingen påvirkning.

ME-verdier som avviker fra 100% tilsier tilstedeværelse av matrikseffekter. ME-korrigert avviker mindre fra 100% enn ME, da internstandard har korrigert for endret ionisering av antiepileptika. ME for høyeste kontroll for karbamazepin og karbamazepinepoksid er nærmere 100% enn ME-korrigert med internstandard. Dette kan skyldes måleusikkerhet i metoden, men i realiteten er resultatene tilnærmet like. Alle ME-verdier er likevel innenfor kravet og internstandard korrigerer godt. Da påvirkningen er minimal, vil ikke detektorens nøyaktighet, sensitivitet og selektivitet for antiepileptika reduseres betraktelig.

### 3.5 Robusthet

Drift ble undersøkt for å vurdere robustheten i analyseserien. Kontroll 2 (QC2) ble injisert to ganger i samme analyseserie, henholdsvis før og etter prøvene. Resultater fra undersøkelse av robusthet for de fire antiepileptiske analyttene er presentert i tabell 16 og som fullstendig beregningstabell i vedlegg 7.



Tabell 16: Bestemmelse av drift (robusthet) for karbamazepin, karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid.

Antiepileptika	Dag		
	1	2	3
<b>Karbamazepin</b>			
Avvik (%) konsentrasjon	0,99	0,49	1,43
Avvik (%) areal	-1,55	-4,95	-15,65
<b>Karbamazepinepoksid</b>			
Avvik (%) konsentrasjon	0,00	0,00	-2,44
Avvik (%) areal	-0,93	-2,01	-14,47
<b>Likarbazepin</b>			
Avvik (%) konsentrasjon	0,00	0,49	-1,40
Avvik (%) areal	0,56	-1,25	-11,71
<b>Zonisamid</b>			
Avvik (%) konsentrasjon	-1,00	0,12	-1,79
Avvik (%) areal	-2,59	-1,14	-5,70

Eksempel på beregning av avvik (%) for QC2 karbamazepin ved bruk av formel 6:

$$\text{Avvik (\%)} = \frac{40,8 \mu\text{M} - 40,4 \mu\text{M}}{40,4 \mu\text{M}} \cdot 100\% = 0,99\%$$

Resultatene for robusthet viste ubetydelige avvik mellom driftskontrollene for samtlige antiepileptika. Det er stigende avvik i areal for antiepileptika på dag tre sammenlignet med de andre dagene. Årsaken kan være et større prøveantall mellom driftskontrollene på dag tre i forhold til foregående dager. Drift kan øke med økende prøveantall, da det blir flere injeksjoner mellom driftskontrollene. Avvik i konsentrasjonene er ubetydelige og internstandarder korrigerer for avviket slik at konsentrasjonen til antiepileptika blir riktig. Driften vil derfor være minimal og det er ikke nødvendig å bytte ut internstandarder.

Dersom metoden skal analysere et betydelig høyere prøveantall enn prøveantallet i denne valideringen, bør drift undersøkes på nytt for å sikre at metoden fremdeles har god robusthet. I oppgaven var høyeste prøveantall mellom driftskontrollene 18 prøver.

### 3.6 IS-recovery

IS-recovery ble undersøkt for å finne normal IS-recovery for analyttene og eventuelt variasjon i areal til IS for analyttene. Arealet til internstandarder ble sammenlignet med gjennomsnittsarealet til standardrekken. Høy standard ble utelatt fra beregningen, da den er over analyttens måleområde. Resultatene presenteres i tabell 17 og vedlegg 8.

Tabell 17: Bestemmelse av minimums- og maksimumsverdier for IS-recovery.

Internstandard	Minimumsverdi (%avvik)	Maksimumsverdi (%avvik)
IS Karbamazepin-d10	-40,7	24,7
IS karbamazepinepoksid-d8	-29,7	19,1
IS Likarbazepin-d3	-31,9	30,2
IS Zonizamid-d4	-16,0	46,0

IS: internstandard

Resultatene viste ingen avvik av betydning i IS-recovery. Grenseverdier for IS-recovery blir satt til å være litt over og litt under normalverdiene for hvert antiepileptika (tabell 17). Den allerede etablerte grenseverdien for prosessering av resultater i TargetLynx er 70 – 130%. Laveste avvik i undersøkelsen er –40,7 % og høyeste 46,0 %. Ut fra dette bør grenseverdiene for IS-recovery settes til 50 – 150%.

### 3.7 Samkjøring mellom detektorene

Avvik mellom resultater på Xevo TQ-S og Xevo TQ-XS ble beregnet for å sammenligne detektorene. Avvikene for de fire antiepileptika er relativt lave, da alle er under 15%. Høyeste avvik er 9,5% for karbamazepin, 13,2% for karbamazepinepoksid, 5,9% for likarbazepin og 8,5% for zonisamid. Se vedlegg 9.

Eksempel på beregning av avvik mellom prøve 1 for karbamazepin ved bruk av formel 7:

$$\text{Avvik (\%)} = \frac{30,6 \mu\text{M} - 32,6 \mu\text{M}}{\left(\frac{30,6 \mu\text{M} + 32,6 \mu\text{M}}{2}\right)} \cdot 100\% = -6,1\%$$

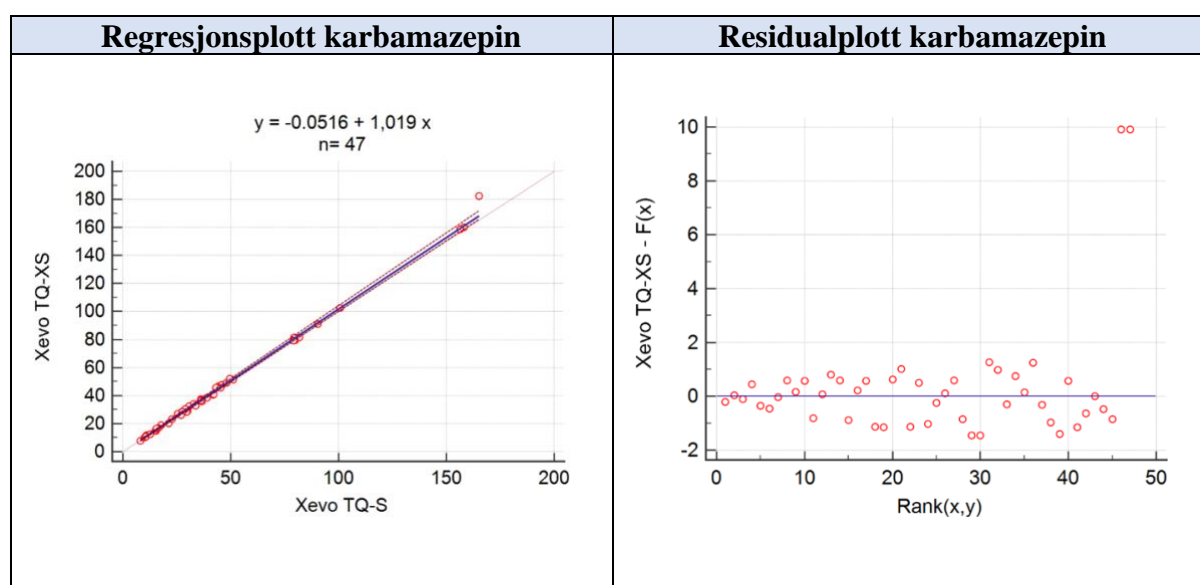
Passing and Bablok regresjonsanalyse ble utført på alle fire antiepileptika for å vurdere samsvar mellom resultater fra Xevo TQ-XS og Xevo TQ-S. Resultatene er presentert i tabell 18-21, figur 16-19 og som fullstendige tabeller og kurver i vedlegg 10.

## Karbamazepin

Resultat fra regresjonsanalyse er presentert i tabell 18 og figur 11.

Tabell 18: Resultater fra Passing and Bablok regresjonsanalyse for karbamazepin.

$y = -0,0105866 + 1,016713 x$	
Variabel X	Xevo TQ-S
Variabel Y	Xevo TQ-XS
Antall prøver	46
Systematiske ulikheter	
Skjæringspunkt A	-0,01059 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	-0,3736 – 0,4481 $\mu\text{mol/L}$
Proporsjonale ulikheter	
Stigning B	1,0167 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	1,0038 – 1,0315 $\mu\text{mol/L}$
Tilfeldige ulikheter	
Residual-standardavvik (RSD)	1,7164 $\mu\text{mol/L}$
$\pm 1,96$ RSD intervall	-3,3642 – 3,3642 $\mu\text{mol/L}$
Lineær validitet	
Kumulativ linearitetstest	P = 0,86



Figur 11: Regresjons- og residualplott fra Passing and Bablok regresjonsanalyse av karbamazepin. I regresjonsplottet tilsvarende de røde, lang-stiplede linjene 95% konfidensintervall, lyserød og kortstiplet linje ekvivalenslinjen, og den blå, heltrukne linjen regresjonslinje.

95% konfidensintervall (KI) for skjæringspunktet A inneholder 0 og det er ikke konstant signifikant forskjell mellom detektorene. KI er smalt og skjæringspunktet vil med høy sannsynlighet ligge nær origo. 95% KI for stigningen B inneholder ikke 1. Det er en statistisk signifikant proporsjonal forskjell mellom detektorene (-1,7%). Avviket og stigningstallet (1,0167) tyder på at Xevo TQ-XS gir høyere resultater enn Xevo TQ-S. KI er smalt og tilsier at estimatet er godt. Da forskjellen er liten, vil det ikke ha klinisk betydning.

Kumulativ linearitetstest ( $P > 0,1$ ) tyder på rettlinjert sammenheng mellom detektorene. Regresjonsplottet viser at avstanden mellom regresjonslinjen og ekvivalenslinjen øker med økende konsentrasjoner og tilsier at Xevo TQ-XS gir høyere resultater enn Xevo TQ-S. Forskjellen er liten og ikke av klinisk betydning for samkjøringen.

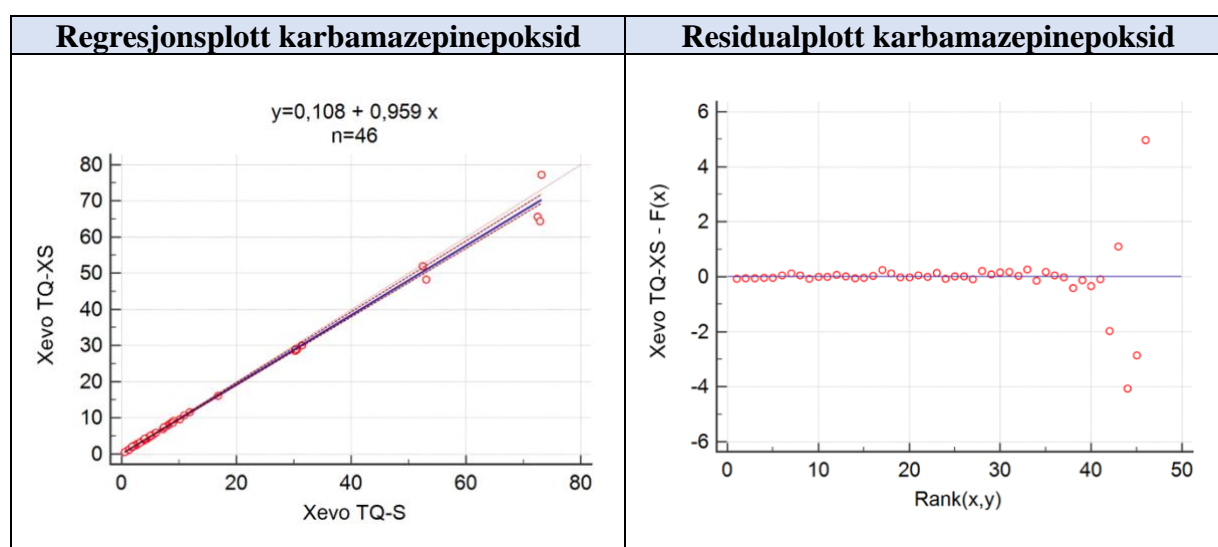
Residualplottet har tilfeldige fordelte residualer rundt  $y = 0$  og det observeres ikke systematiske trender. Det er samsvar mellom regresjonslinjen og målte verdier.  $\pm 1,96$  RSD-intervallet er smalt og indikerer at detektorene er relativt like, samt at regresjonslinjen er forutsigbar. RSD er nærme 0 og tilsier få tilfeldige forskjeller mellom detektorene.

## Karbamazepinepoksid

Resultat fra regresjonsanalyse er presentert i tabell 19 og figur 12.

Tabell 19: Resultater fra Passing and Bablok regresjon for karbamazepinepoksid.

$y = 0,108163 + 0,959184 x$	
Variabel X	Xevo TQ-S
Variabel Y	Xevo TQ-XS
Antall prøver	46
Systematiske ulikheter	
Skjæringspunkt A	0,1082 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	0,02245 – 0,1974 $\mu\text{mol/L}$
Proporsjonale ulikheter	
Stigning B	0,9592 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	0,9474 – 0,9796 $\mu\text{mol/L}$
Tilfeldige ulikheter	
Residual-standardavvik (RSD)	1,1195 $\mu\text{mol/L}$
$\pm 1,96$ RSD intervall	-2,1941 – 2,1941 $\mu\text{mol/L}$
Lineær validitet	
Kumulativ linearitetstest	P = 0,39



Figur 12: Regresjons- og residualplott fra Passing and Bablok regresjonsanalyse av karbamazepinepoksid. I regresjonsplottet tilsvarende de røde, lang-stiplede linjene 95% konfidensintervall, lyserød og kortstiplet linje ekvivalenslinjen, og den blå, heltrukne linjen regresjonslinjen.

95% KI for skjæringspunktet A inneholder ikke 0 og det er en konstant forskjell mellom detektorene. KI er smalt og estimatet er derfor godt. Den konstante forskjellen mellom detektorene er liten ( $0,1 \mu\text{mol/L}$ ) og ikke være av klinisk betydning. 95% KI for stigningen B inneholder ikke 1 og tyder på en proporsjonal forskjell mellom detektorene (4,1%). KI er smalt og estimatet er godt. Estimatet viser at Xevo TQ-XS gir lavere resultater enn Xevo TQ-S ved økende konsentrasjoner. Den estimerte, proporsjonale forskjellen er liten og ikke av klinisk betydning.

Kumulativ linearitetstest ( $P > 0,1$ ) tyder på lineær sammenheng mellom detektorene. Regresjonsplottet viser økende avstand mellom regresjonslinjen og ekvivalenslinjen ved økende konsentrasjoner, og regresjonslinjen ligger under ekvivalenslinjen. Dette viser at Xevo TQ-XS gir lavere resultater enn Xevo TQ-S. Forskjellen er liten og ikke av klinisk betydning.

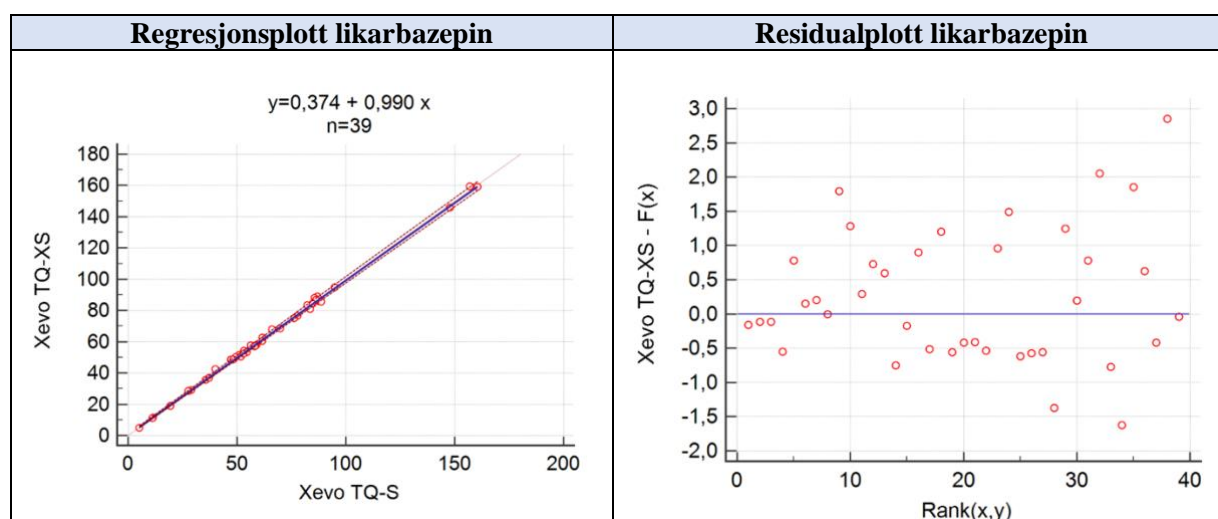
Residualplottet viser at residualene er tilfeldig fordelt rundt  $y = 0$  med vifteformet spredning. Dette oppstår da verdiene er sortert etter økende konsentrasjoner på x-aksen. Økt konsentrasjon vil gi økt spredning. Det observeres ingen systematiske trender.  $\pm 1,96$  RSD-intervallet er smalt og tilsier at detektorene er relativt like og regresjonslinjen er forutsigbar. RSD er nærme 0 og indikerer at verdiene passer sammen, og det er få tilfeldige feil.

## Likarbazepin

Resultat fra regresjonsanalyse er presentert i tabell 20 og figur 13.

Tabell 20: Resultater fra Passing and Bablok regresjon for likarbazepin.

$y = 0,373742 + 0,989899 x$	
Variabel X	Xevo TQ-S
Variabel Y	Xevo TQ-XS
Antall prøver	39
Systematiske ulikheter	
Skjæringspunkt A	0,3737 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	-0,02157 – 1,1237 $\mu\text{mol/L}$
Proporsjonale ulikheter	
Stigning B	0,9899 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	0,9768 – 1,0067 $\mu\text{mol/L}$
Tilfeldige ulikheter	
Residual-standardavvik (RSD)	1,0231 $\mu\text{mol/L}$
$\pm 1,96$ RSD intervall	-2,0053 – 2,0053 $\mu\text{mol/L}$
Lineær validitet	
Kumulativ linearitetstest	P = 0,77



Figur 13: Regresjons- og residualplott fra Passing and Bablok regresjonsanalyse av likarbazepin. I regresjonsplottet tilsvarende de røde, lang-stiplede linjene 95% konfidensintervall, lyserød og kortstiplet linje ekvivalenslinjen, og den blå, heltrukne linjen regresjonslinje.

95% KI for skjæringspunktet A inneholder 0 og det er ikke konstant signifikant forskjell mellom detektorene. KI er smalt og origo ligger med høy grad av sannsynlighet i skjæringspunktet. 95% KI for stigningen B inneholder 1. Det er ikke en signifikant, proporsjonal forskjell mellom detektorene (1,0%). KI er smalt, estimatet er godt og forskjellen mellom detektorene er liten.

Kumulativ linearitetstest ( $P > 0,1$ ) tyder på lineær sammenheng mellom detektorene. Regresjonsplottet viser at ekvivalenslinjen ligger innenfor 95% KI, og regresjonlinjen ligger nært ekvivalenslinjen. Dette viser at resultatene fra de to detektorene passer godt sammen.

Residualplottet viser jevnt fordelte residualer rundt  $y = 0$ , men residualene over  $y = 0$  avviker mer fra linjen sammenlignet med residualene under. Dette betyr at noen av de målte antiepileptikaverdiene på Xevo TQ-XS er høyere enn verdiene fra regresjonsligningen. Forskjellen er liten og derfor ubetydelig.  $\pm 1,96$  RSD-intervallet er smalt og indikerer at detektorene er relativt like og at regresjonlinjen er forutsigbar. RSD ligger nærme 0 og det er få tilfeldige forskjeller mellom detektorene som er av betydning.

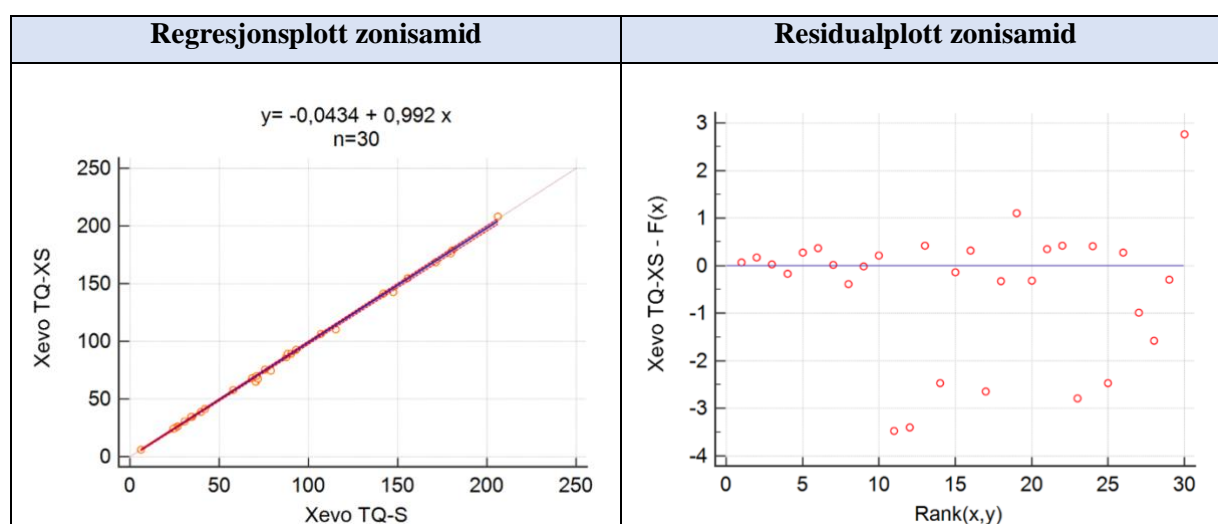


## Zonisamid

Resultat fra regresjonsanalyse er presentert i tabell 21 og figur 14.

Tabell 21: Resultater fra Passing and Bablok regresjon for zonisamid.

$y = -0,0434452 + 0,992006 x$	
Variabel X	Xevo TQ-S
Variabel Y	Xevo TQ-XS
Antall prøver	30
Systematiske ulikheter	
Skjæringspunkt A	-0,04345 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	-0,5500 – 0,4368 $\mu\text{mol/L}$
Proporsjonale ulikheter	
Stigning B	0,9920 $\mu\text{mol/L}$
95% KI	0,9815 – 1,0000 $\mu\text{mol/L}$
Tilfeldige ulikheter	
Residual-standardavvik (RSD)	1,5182 $\mu\text{mol/L}$
$\pm 1,96$ RSD intervall	-2,9757 – 2,9757 $\mu\text{mol/L}$
Lineær validitet	
Kumulativ linearitetstest	P = 0,34



Figur 14: Regresjons- og residualplott fra Passing and Bablok regresjonsanalyse av zonisamid. I regresjonsplottet tilsvarende de røde, lang-stiplede linjene 95% konfidensintervall, lyserød og kortstiplet linje ekvivalenslinjen, og den blå, heltrukne linjen regresjonslinjen.

95% KI for skjæringspunktet A inneholder 0. Det er ikke en systematisk, konstant forskjell mellom detektorene. KI er smalt og skjæringspunktet ligger med høy sannsynlighet ligge nær origo. 95% KI for stigningen B inneholder 1. Det er ikke en proporsjonal signifikant forskjell mellom detektorene (0,1%). KI er smalt, forskjellen er liten og estimatet er godt.

Kumulativ linearitetstest ( $P > 0,1$ ) tyder på lineær sammenheng mellom detektorene.

Regresjonsplottet viser at 95% KI omfatter ekvivalenslinjen. Regresjonslinjen ligger nært ekvivalenslinjen og tilsier samsvar mellom de to detektorene.

Residualplottet viser jevnt fordelte residualer rundt  $y = 0$ . Residualene under  $y = 0$  avviker mer fra linjen sammenlignet med residualene over. Dette tyder på at noen av de målte verdiene på Xevo TQ-XS er lavere enn antatt fra regresjonslinjen. Forskjellen er liten og ikke av klinisk betydning.  $\pm 1,96$  RSD-intervallet er smalt og tilsier at detektorene er relativt like, samt delvis fravær av tilfeldige forskjeller mellom detektorene. RSD er nærme 0 og tilsier at verdiene passer sammen og regresjonslinjen er forutsigbar.

Ut fra resultatene fra samkjøringen mellom detektorene kan Xevo TQ-XS anvendes for kvantifisering av antiepileptika i serum.

## 4 Konklusjoner

Følgende konklusjoner svarer på problemstillingene (Jf. avsnitt 1.7 side. 13).

- Samtlige antiepileptika innfrir kravene for S/N-ratio ( $\geq 30$ ), CV ( $< 20,0\%$ ) og nøyaktighet ( $< \pm 20,0\%$ ) ved vurdering av nedre kvantifiseringsgrense.
- Korrelasjonskoeffisientene viser god lineær sammenheng hos alle fire antiepileptika i tilhørende måleområder (gjennomsnittlig  $R = 0,9999$ ). Standardkurver med høy standard inkludert viser tilfredsstillende linearitet for hvert antiepileptika etter aktuelle måleområder ( $R = 0,9999$ ).
- Samtlige antiepileptika tilfredsstiller kravet for reproduserbarhet ( $CV \leq 15,0\%$ ).
- Alle fire antiepileptika innfrir kravet for nøyaktighetsavviket ( $\leq 15,0\%$ ).
- Karbamazepin, likarbazepin og zonisamid tilfredsstiller kravet for Z-verdi ( $Z \leq 2$ ). Karbamazepinopksid har Z-verdier utenfor kravet og må undersøkes videre.
- Matrikseffekt både med og uten korrigering med internstandard for samtlige antiepileptika innfrir kravet (75 – 125%) og påvirkningen fra matrikssubstanser er minimal.
- Avviket til driftskontrollen for de fire antiepileptika er under 2,0% og uten betydning. Internstandarden har korrigert for avvik i areal og metoden er robust.
- Normal IS-recovery ligger litt over og litt under maksimums- og minimumsverdiene for karbamazepin (-40,7 – 24,7%), karbamazepinopksid (-29,7 – 19,1%), likarbazepin (-31,9 – 30,2%) og zonisamid (-16,0 – 46,0%). Foreslåtte grenseverdier for IS-recovery er 50 – 150%.
- Passing and Bablok regresjonsanalyse av karbamazepin, karbamazepinopksid, likarbazepin og zonisamid viser at det er samsvar mellom Xevo TQ-XS og Xevo TQ-S.

Undersøkelsen viser i sin helhet at det er nødvendig å undersøke avvikende SLP-er for karbamazepinopksid før Xevo TQ-XS kan anvendes for kvantifisering av antiepileptika (karbamazepin, karbamazepinopksid, likarbazepin og zonisamid) i serum.

## 5 Referanser

1. Xevo TQ-XS Triple Quadrupole Mass Spectrometry | Waters [Internett]. [sitert 21. april 2022]. Tilgjengelig på: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/Xevo-TQ-XS-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134889751&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/Xevo-TQ-XS-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134889751&locale=en_US)
2. Hansen H, Michelsen LS. Valideringsplan KOZ serum. St. Olavs Hospital, Avdeling for klinisk farmakologi; 2016.
3. Levy FES. terapeutisk indeks. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2020 [sitert 15. mars 2022]. Tilgjengelig på: [http://sml.snø.no/terapeutisk\\_indeks](http://sml.snø.no/terapeutisk_indeks)
4. G16.1 Terapikontroll (TDM) | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 15. mars 2022]. Tilgjengelig på: [https://www.legemiddelhandboka.no/G16.1/Terapikontroll\\_\(TDM\)](https://www.legemiddelhandboka.no/G16.1/Terapikontroll_(TDM))
5. Legemiddelgrupper som det hyppig foretas konsentrasjonsbestemmelse av [Internett]. [sitert 15. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://farmakologi.portfolio.no/read/1540f350-6420-4a07-9cf2-2cd958498c44>
6. Pedersen-Bjergaard S, Hansen SH. Bioanalysis of pharmaceuticals. 1. utg. United Kingdom: John Wiley & Sons; 2015.
7. Nyberg HM. Metodebeskrivelse KOZ i serum og fullblod. 2021.
8. Precipitation of Detergent-Containing Samples for Top-Down and Bottom-Up Proteomics | IntechOpen [Internett]. [sitert 28. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.intechopen.com/chapters/66447>
9. Michelsen LS. Prøveopparbeidelse for kromatografiske analyser. :14.
10. Frequently Asked Questions: Sample Preparation [Internett]. 2020 [sitert 28. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.restek.com/row/frequently-asked-questions-faqs/frequently-asked-questions-sample-preparation/>
11. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. Kromatografi: Separasjon og deteksjon. 3. utg. Oslo: Universitetsforlaget; 1998.
12. Cech NB, Enke CG. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrom Rev.* 2001;20(6):362–87.
13. Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) - MagLab [Internett]. [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/tandem-ms>
14. LC-MS-MS | Liquid Chromatography [Internett]. EAG Laboratories. [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.eag.com/techniques/mass-spec/lc-ms-ms/>
15. LC-MS Services for Standard and Custom Methods [Internett]. [sitert 1. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://emerypharma.com/chemistry/lcms-services/>
16. Understanding LC/MS/MS [Internett]. Certara. 2014 [sitert 6. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.certara.com/knowledge-base/understanding-lcmsms/>
17. LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS [Internett]. Analysis & Separations from Technology Networks. [sitert 6. april 2022]. Tilgjengelig på:

<http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>

18. StepWave | Waters [Internett]. [sitert 29. april 2022]. Tilgjengelig på: [https://www.waters.com/waters/en\\_US/StepWave/nav.htm?cid=134673601&locale=en\\_US](https://www.waters.com/waters/en_US/StepWave/nav.htm?cid=134673601&locale=en_US)
19. Rafai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 8. United States of America: Elsevier; 2019.
20. Zonisamide-d4 | Stable Isotope | MedChemExpress [Internett]. MedchemExpress.com. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.medchemexpress.com/zonisamide-d4.html>
21. Carbamazepine 10,11-Epoxyde-d8 (Major) | 1a,10b-Dihydro-6H-dibenzo[b,f]oxireno[d]azepine-6-carboxamide-d8; 10,11-Dihydro-10,11-epoxycarbamazepine-d8; 10,11-Epoxycarbamazepine-d8; Carbamazepine-d8 10,11-Oxide; GP 49-023-d8; | C<sub>15</sub>H<sub>4</sub>D<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> | TRC [Internett]. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.trc-canada.com/product-detail/?C175854>
22. Carbamazepine-D10 100ug/mL methanol, ampule 1mL, certified reference material, Cerilliant 132183-78-9 [Internett]. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.sigmaaldrich.com/NO/en/product/cerillian/c094>
23. Licarbazepine-d3 (BIA 2-005-d3) | Sodium Channel Inhibitor | MedChemExpress [Internett]. [sitert 29. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.medchemexpress.com/licarbazepine-d3.html>
24. Loevenich M. Plan for samkjøring KOZ, serum, UPLC-MSMS Xevo TQ-S (F) og TQ-XS (K). St. Olavs Hospital, Avdeling for klinisk farmakologi; 2022.
25. Guo X. Advances in Gas Chromatography. BoD – Books on Demand; 2014. 226 s.
26. Greibrokk T, Lundanes E, Reubsaet L. Chromatography: Basic Principles, Samlpe Preparations and Related Methods. 1. utg. Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.; 2014.
27. Burtis CA, Bruns DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 7. utg. Missouri: Elsevier; 2015.
28. Bolann BJ, Åsberg A. Riktige svar på biokjemiske analyser. 1. utg. Oslo: Cappelen Damm AS; 2021.
29. Visser RG. Interpretation of interlaboratory comparison results to evaluate laboratory proficiency. Accreditation Qual Assur. februar 2006;10(10):521–6.
30. Gold V, redaktør. The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book [Internett]. 4. utg. Research Triangle Park, NC: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); 2019 [sitert 28. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://goldbook.iupac.org/>
31. Matrix effects and application of matrix effect factor | Bioanalysis [Internett]. [sitert 25. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.future-science.com/doi/full/10.4155/bio-2017-0214>

32. Microlab STAR Line Operations Manual. Hamilton Robotics;
33. BioRender | Life Science Icons [Internett]. BioRender | Life Science Icons. [sitert 20. mars 2022]. Tilgjengelig på: <https://biorender.com/icon/lab-and-objects/machinery-and-tech/positive-pressure-manifold/>
34. Sylten L. LC-MSMS Waters - Flytskjema analyse. St.Olavs Hospital, Avdeling for klinisk farmakologi; 2021.

## 6 Vedlegg

### Innholdsfortegnelse

<b>Vedlegg 1 .....</b>	<b>side 43-44</b>
<b>Vedlegg 2 .....</b>	<b>side 45-46</b>
<b>Vedlegg 3 .....</b>	<b>side 47-50</b>
<b>Vedlegg 4 .....</b>	<b>side 51</b>
<b>Vedlegg 5 .....</b>	<b>side 52</b>
<b>Vedlegg 6 .....</b>	<b>side 53-54</b>
<b>Vedlegg 7 .....</b>	<b>side 55</b>
<b>Vedlegg 8 .....</b>	<b>side 56-59</b>
<b>Vedlegg 9 .....</b>	<b>side 60-61</b>
<b>Vedlegg 10 .....</b>	<b>side 62</b>

## Vedlegg 1: Framgangsmåte for prøveopparbeidelse flytskjema (KOZ)

### Flytskjema KOZ Serum

KOPI

Beskrivelse	Prøve/reagenser/utstyr	Volum	Posisjon Hamilton
Prøveblanding	Std/QC	50 µl	Spor 39, pos 5 (2A-2H) (Test av ny rekke: 4A-4H)
	Prøver	50 µl	Spor 51 - 54
	KOZ-I.S 20%MeOH i H <sub>2</sub> O	25 µl	Spor 45, pos 1
Filtreringsplate	Ostro™ 96-brønnsplate		Spor 39, pos 4 Plasseres oppå en mikrotiterplate
Fellingsreagens	ACN m/ 1% FAc (iskald, rett fra fryser) NB! Reagenskaret må være minst halvfullt	725 µl	Spor 39, pos 3
Engangsspisser (Std/QC, prøver)	MIStar 50 µl standard volum spiss med filter		Spor 21, pos 5
Engangsspisser (Internstandard)	MIStar 300 µl standard volum spiss uten filter		Spor 21 og 27, pos 3
Engangsspisser (Fellingsreag. serum)	MIStar 1000 µl standard volum spiss med filter		Spor 21, pos 2
Engangsspisser (Kun fullblod)	MIStar 1000 µl standard volum spiss uten filter		Spor 21 og 27, pos 1
Tom plate til engangsspisser	Tip Support		Spor 27, pos 2

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



PPP



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



Uteståendeliste: TF\_Koz i serum\_Lab  
Batchtype: KOZS

**Robotscript**

<i>Robot</i>	<i>Script</i>
Hamilton ML Star	KOZ_vx_x*

\*Ny Std/QC-rekke plasseres i rad 4 i matriksboks

**Instrumentinformasjon**

<i>Beskrivelse</i>	<i>Innstillinger</i>
Metode	KOZ_S_x
Analyseinstrument	LC-MSMS F og LC-MSMS G
Mobilfaser	A: 0,1% FAc og B: MeOH
Injeksjonsvolum	0,5 µl
Run-tid	2,5 min
Tolkningsmetode	KOZ_S_Tolkx

(x = versjonsnr.)

Etter pipettering på Hamilton, vil det lages en excelfil som beskriver den enkelte prøves posisjon i plata. Denne filen vil lagres fortløpende under:  
C:\Program Files(x86)\HAMILTON\LogFiles\MappingFile\KOZ

**Holdbarhet:**

Ferdig opparbeidete prøver oppbevart ved 4-10°C, kan reinjiseres innen 5 dager.

## Vedlegg 2: Kvantifiseringsgrenser og S/N-ratio for antiepileptika

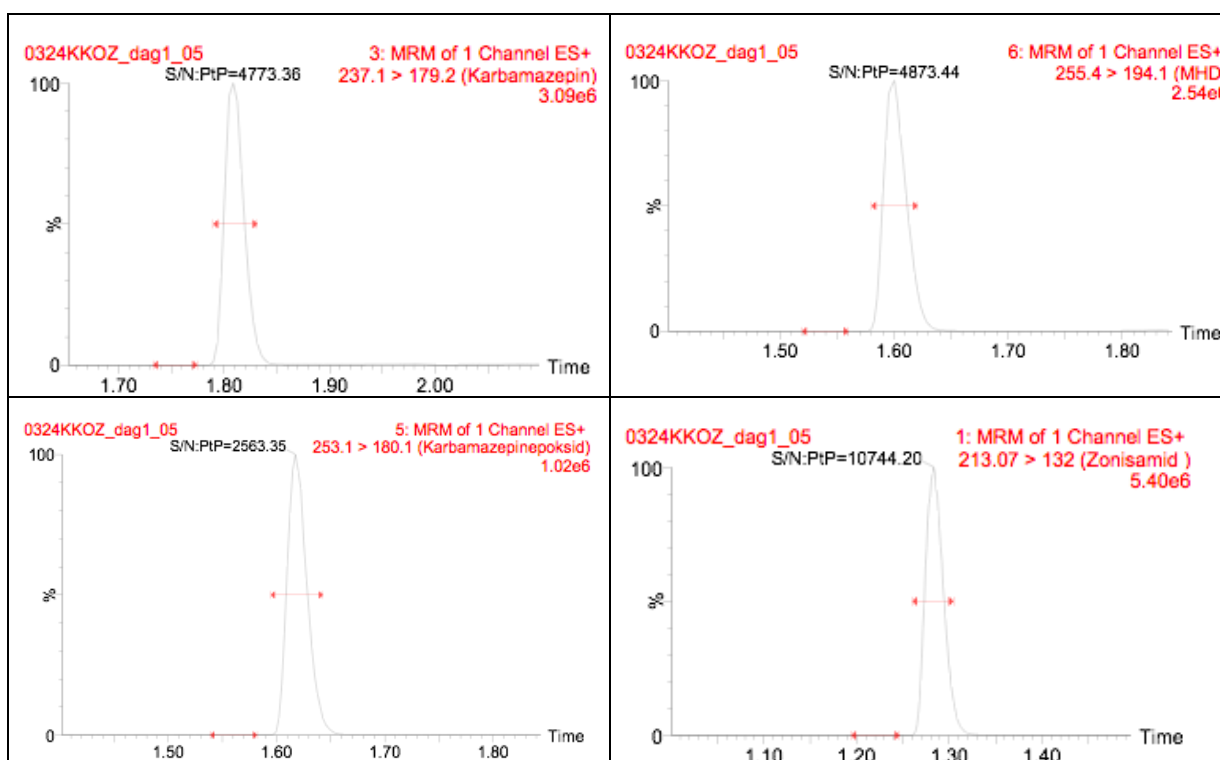
Fullstendig beregningstabell for S/N-ratio til hvert antiepileptika over tre dager.

Datasekvens	Antiepileptika			
	Karbamazepin	Karbamazepinepoxid	Likarbamazepin	Zonisamid
	S/N	S/N	S/N	S/N
0324KKOZ_dag1	4776,36	2563,35	4873,44	10744,20
0328KKOZ_dag2	2229,96	1935,96	2576,02	3324,38
0330KKOZ_dag3	2791,81	2900,96	4843,57	4941,66

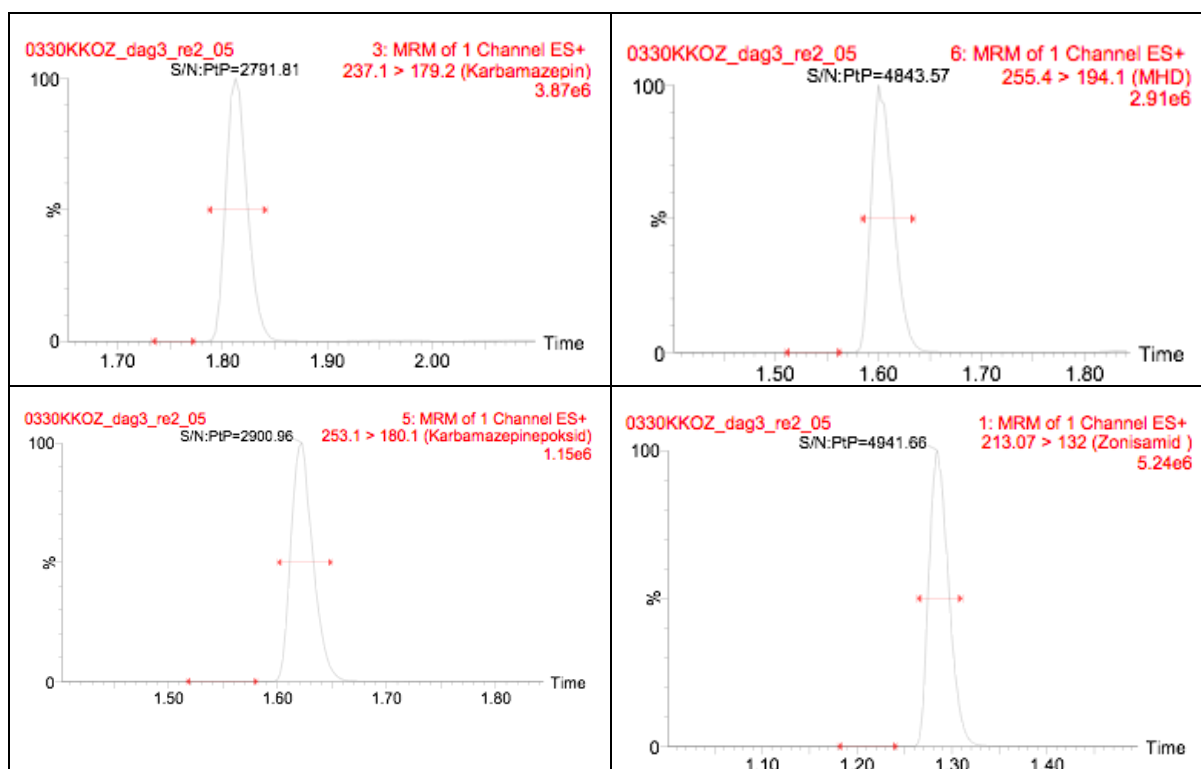
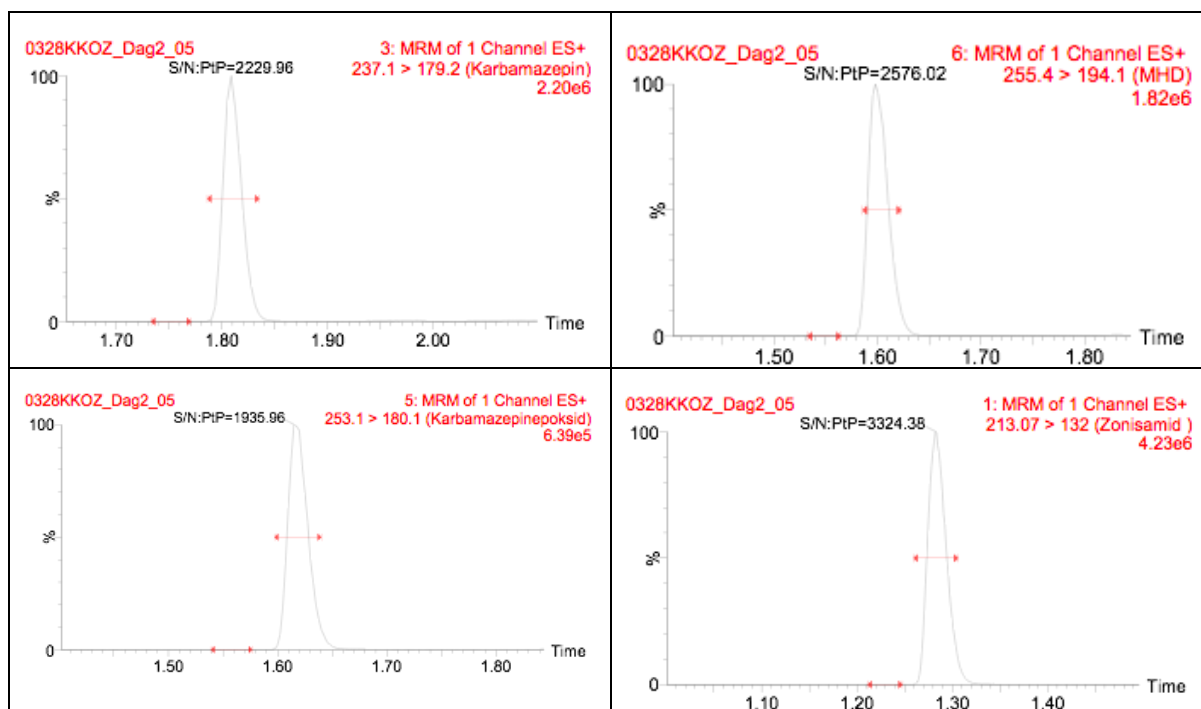
Fullstendig beregningstabell for nøyaktighet og presisjon (CV) ved nedre kvantifiseringsgrense for hvert antiepileptika over tre dager.

Datasekvens	Antiepileptika			
	Karbamazepin	Karbamazepinepoxid	Likarbamazepin	Zonisamid
	Std1	Std1	Std1	Std1
0324KKOZ_dag1	2,4	0,25	2,5	5
0328KKOZ_dag2	2,5	0,25	2,5	4,9
0330KKOZ_dag3	2,4	0,25	2,4	4,9
Gjennomsnitt	2,43	0,25	2,47	4,93
SD	0,06	0,0	0,1	0,1
%CV	2,4	0,0	2,3	1,2
Teoretisk verdi	2,5	0,25	2,5	5
Nøyaktighet (%)	97,3	100,0	98,7	98,7
Nøyaktighet (%avvik)	-2,7	0,0	-1,3	-1,3

Kromatogram for hvert antiepileptika ved ved beregning S/N-ratio dag en, to og tre.



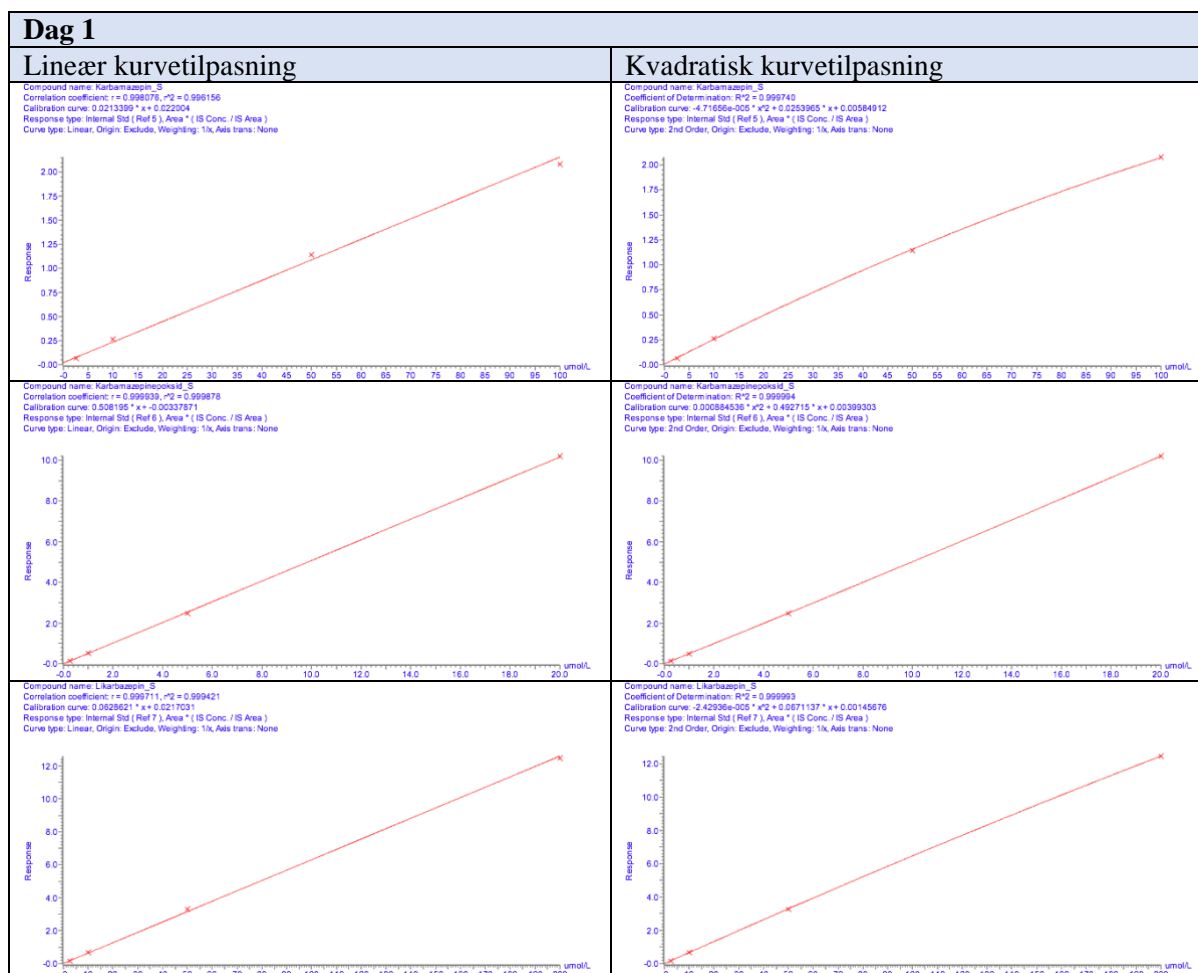
Kromatogram for hvert antiepileptika ved ved beregning S/N-ratio dag en, to og tre.

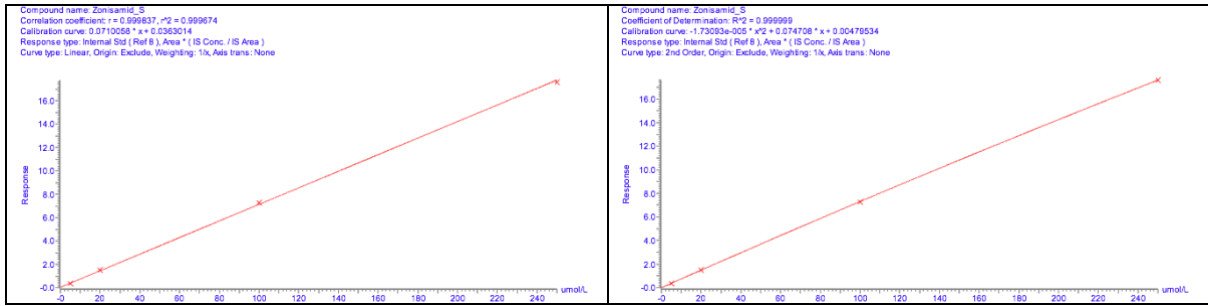


## Vedlegg 3: Linearitet og standardkurver

Fullstendig tabell over korrelasjonskoeffisienten og tilhørende måleområder for hvert antiepileptika over tre dager.

Datafil	Analytt	Måleområde	Korrelasjonskoeffisient R
0324KKOZ_dag1	Karbamazepin	2,5 - 100	0,9981
0328KKOZ_dag2	Karbamazepin	2,5 - 100	0,9985
0330KKOZ_dag3	Karbamazepin	2,5 - 100	0,9992
0324KKOZ_dag1	Karbamazepinepoksid	0,25 - 20	0,9999
0328KKOZ_dag2	Karbamazepinepoksid	0,25 - 20	0,9998
0330KKOZ_dag3	Karbamazepinepoksid	0,25 - 20	0,9996
0324KKOZ_dag1	Likarbazepin	2,5 - 200	0,9997
0328KKOZ_dag2	Likarbazepin	2,5 - 200	0,9999
0330KKOZ_dag3	Likarbazepin	2,5 - 200	0,9999
0324KKOZ_dag1	Zonisamid	5,0 - 250	0,9998
0328KKOZ_dag2	Zonisamid	5,0 - 250	0,9999
0330KKOZ_dag3	Zonisamid	5,0 - 250	0,9999

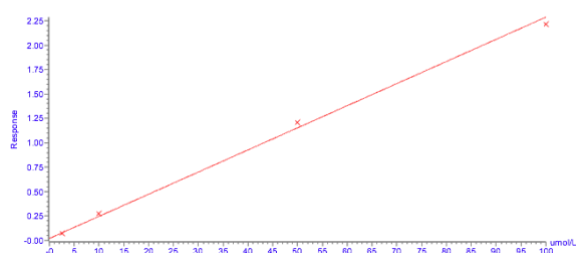




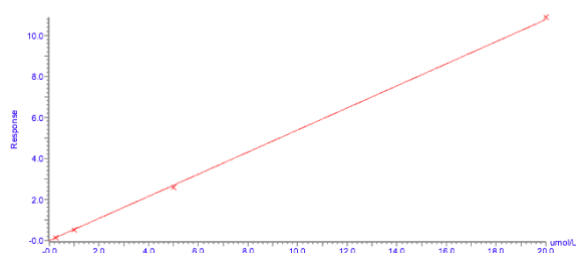
## Dag 2

### Lineær kurvetilpasning

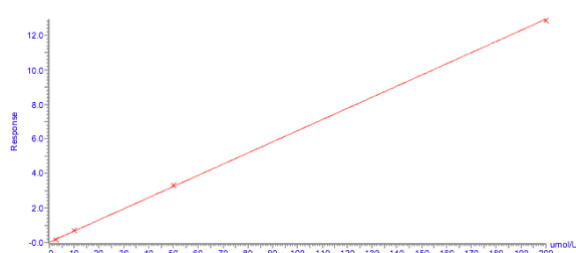
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998534$ ,  $r^2 = 0.997070$   
 Calibration curve:  $0.0226501 * x + 0.0211283$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



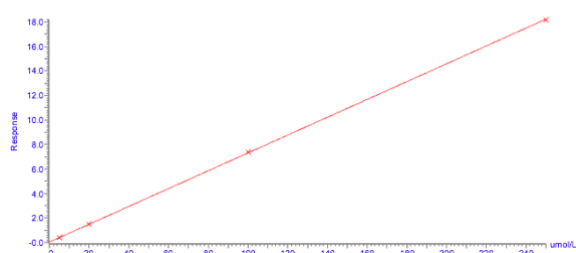
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999750$ ,  $r^2 = 0.999500$   
 Calibration curve:  $0.538332 * x + 0.0740279$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



Compound name: L-karbazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999943$ ,  $r^2 = 0.999885$   
 Calibration curve:  $0.0945689 * x + 0.0172397$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None

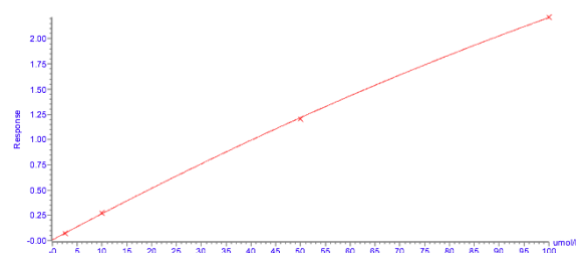


Compound name: Zonisamid\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999559$ ,  $r^2 = 0.999917$   
 Calibration curve:  $0.0728221 * x + 0.0337202$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None

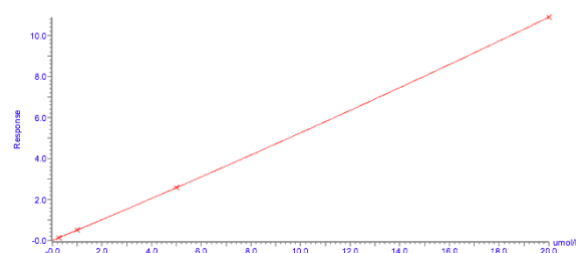


### Kvadratisk kurvetilpasning

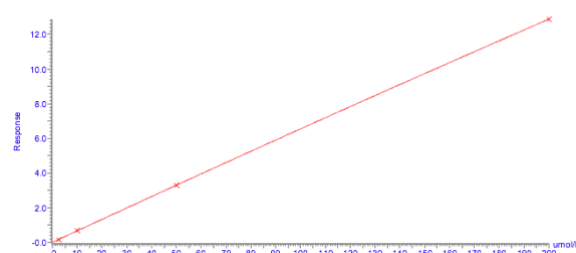
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999673$   
 Calibration curve:  $-4.42539e-005 * x^2 + 0.0264563 * x + 0.00566872$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



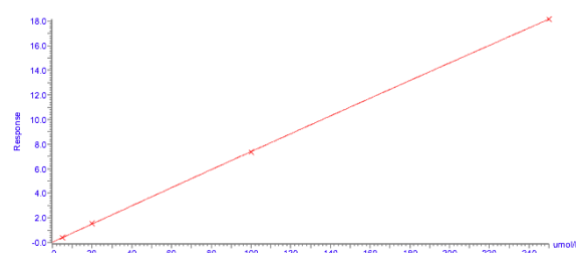
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999996$   
 Calibration curve:  $0.00194198 * x^2 + 0.000348 * x + 0.00216605$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



Compound name: L-karbazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999995$   
 Calibration curve:  $-1.09868e-005 * x^2 + 0.0665185 * x + 0.00809852$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



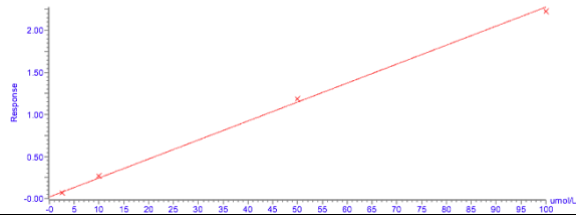
Compound name: Zonisamid\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999977$   
 Calibration curve:  $-7.61863e-006 * x^2 + 0.0744516 * x + 0.0198529$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/k, Axis trans: None



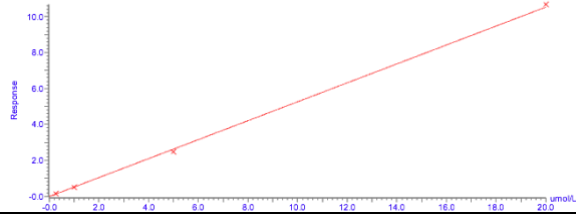
# Dag 3

## Lineær kurvetilpasning

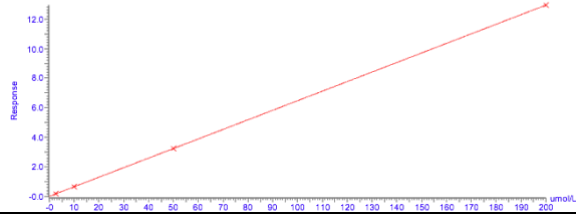
Compound name: Karbamaazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.99167$ ,  $r^2 = 0.98334$   
 Calibration curve:  $0.0225967 * x + 0.0189705$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



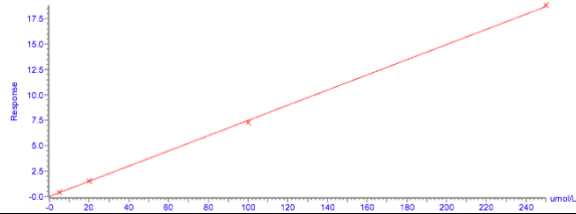
Compound name: Karbamaazepinoksid\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.99955$ ,  $r^2 = 0.999101$   
 Calibration curve:  $0.527366 * x + 0.0135189$   
 Response type: Internal Std (Ref 6), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Liharsazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.99982$ ,  $r^2 = 0.999924$   
 Calibration curve:  $0.0646299 * x + 0.0163184$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

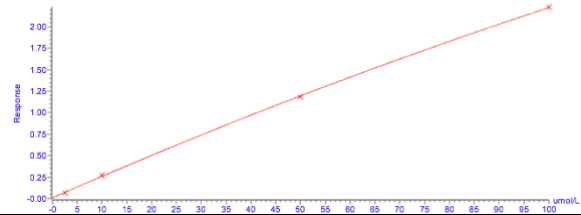


Compound name: Zonisamid\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.99908$ ,  $r^2 = 0.99816$   
 Calibration curve:  $0.0747436 * x + 0.010974$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

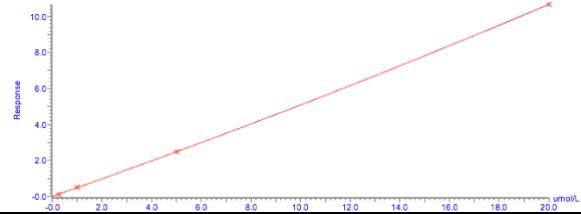


## Kvadratisk kurvetilpasning

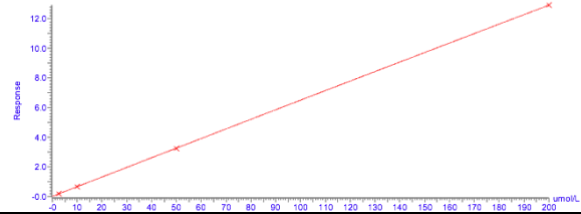
Compound name: Karbamaazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999798$   
 Calibration curve:  $-3.18912e-005 * x^2 + 0.0253397 * x + 0.0084731$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



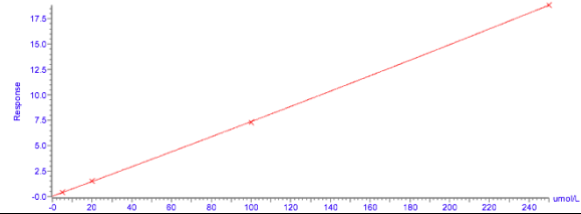
Compound name: Karbamaazepinoksid\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999987$   
 Calibration curve:  $0.00253878 * x^2 + 0.482935 * x + 0.00763935$   
 Response type: Internal Std (Ref 6), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Liharsazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999940$   
 Calibration curve:  $-4.17441e-008 * x^2 + 0.0553605 * x + 0.0128394$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

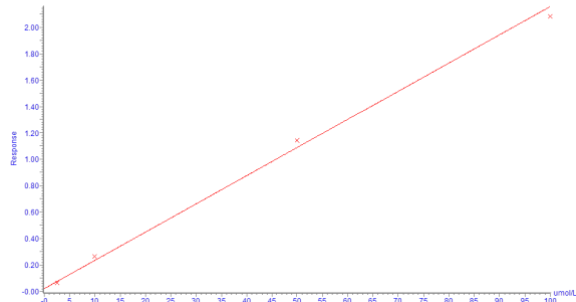


Compound name: Zonisamid\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999961$   
 Calibration curve:  $1.21607e-005 * x^2 + 0.0721304 * x + 0.0331633$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

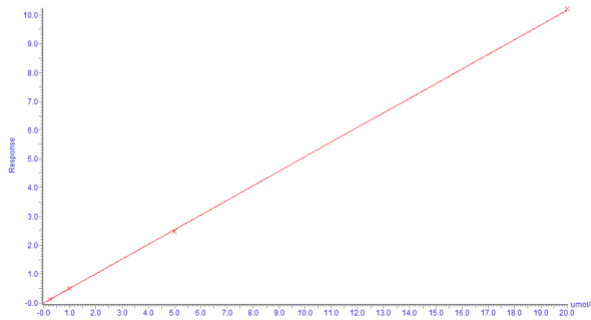


## Lineær kurvetilpasning, høy standard

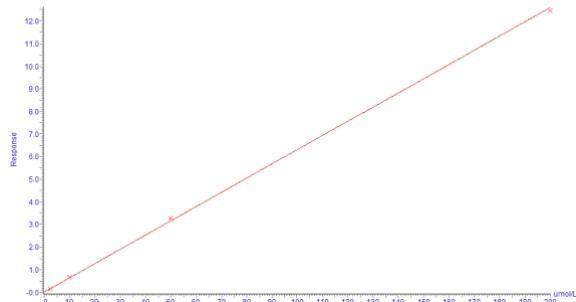
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999076$ ,  $r^2 = 0.998159$   
 Calibration curve:  $0.0213389 \cdot x + 0.022004$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



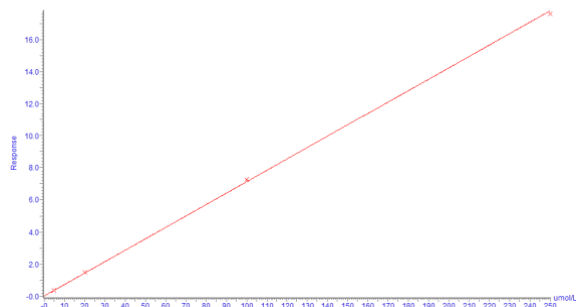
Compound name: Karbamazepinopoksid\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999939$ ,  $r^2 = 0.999879$   
 Calibration curve:  $0.598195 \cdot x - 0.00337871$   
 Response type: Internal Std (Ref 6), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Liribazepin\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999711$ ,  $r^2 = 0.999421$   
 Calibration curve:  $0.0229621 \cdot x + 0.0217031$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

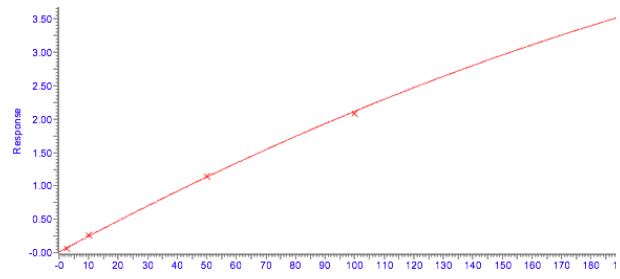


Compound name: Zonisamid\_S  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999837$ ,  $r^2 = 0.999674$   
 Calibration curve:  $0.0710059 \cdot x + 0.0303014$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

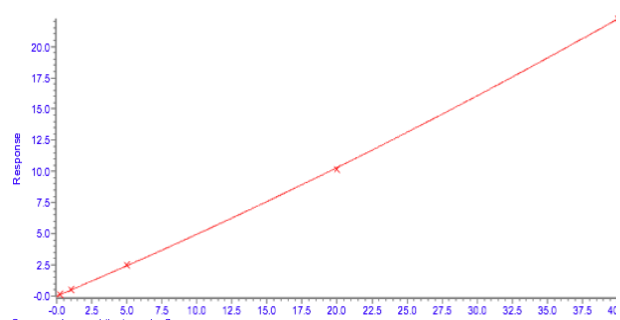


## Kvadratisk kurvetilpasning, høy standard

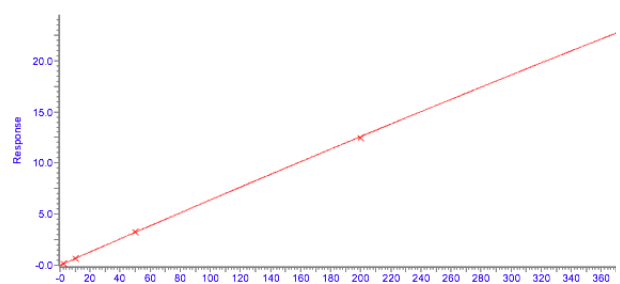
Compound name: Karbamazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999548$   
 Calibration curve:  $-2.79951e-005 \cdot x^2 + 0.0238051 \cdot x + 0.0116815$   
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



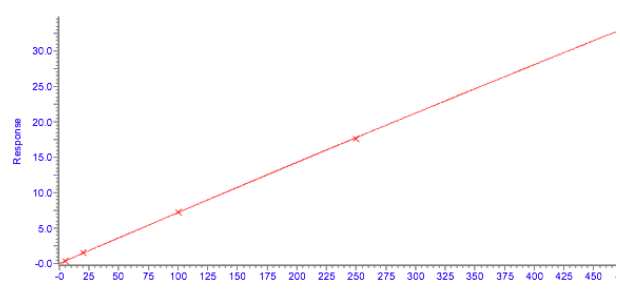
Compound name: Karbamazepinopoksid\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999928$   
 Calibration curve:  $0.00199211 \cdot x^2 + 0.474919 \cdot x + 0.0121549$   
 Response type: Internal Std (Ref 6), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Liribazepin\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999900$   
 Calibration curve:  $-9.13875e-006 \cdot x^2 + 0.0647121 \cdot x + 0.0124595$   
 Response type: Internal Std (Ref 7), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Zonisamid\_S  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.999934$   
 Calibration curve:  $-5.7802e-006 \cdot x^2 + 0.0724491 \cdot x + 0.023135$   
 Response type: Internal Std (Ref 8), Area \* (IS Conc. / IS Area)  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



## Vedlegg 4: Reproduserbarhet og nøyaktighet

Fullstendig beregningstabell for reproduserbarhet (CV) og nøyaktighet (avvik) for kontrollene (QC) for karbamazepin over tre dager.

Datafil	Karbamazepin	QC1 (µmol/L)	QC2 (µmol/L)	QC3 (µmol/L)
0324KKOZ_dag1	Serie1	5,2	40,4	81
0328KKOZ_dag2	Serie2	5	40,6	80,7
0330KKOZ_dag3	Serie3	5,1	41,9	80,1
	Gjennomsnitt	<b>5,1</b>	<b>41,0</b>	<b>80,6</b>
	SD	0,10	0,81	0,46
	%CV	<b>2,0</b>	<b>2,0</b>	<b>0,6</b>
	Teoretisk verdi	5	40	80
	Nøyaktighet (%)	102,0	102,4	100,8
	<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>2,0</b>	<b>2,4</b>	<b>0,7</b>

Fullstendig beregningstabell for reproduserbarhet (CV) og nøyaktighet (avvik) for kontrollene (QC) for karbamazepin epoksid over tre dager.

Datafil	Karbamazepin epoksid	QC1 (µmol/L)	QC2 (µmol/L)	QC3 (µmol/L)
0324KKOZ_dag1	Serie1	0,5	4	15,1
0328KKOZ_dag2	Serie2	0,5	4	14,8
0330KKOZ_dag3	Serie3	0,5	4,1	14,5
	Gjennomsnitt	<b>0,5</b>	<b>4,0</b>	<b>14,8</b>
	SD	0,00	0,06	0,30
	%CV	<b>0,0</b>	<b>1,4</b>	<b>2,0</b>
	Teoretisk verdi	1	4	15
	Nøyaktighet (%)	100,0	100,8	98,7
	<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>0,0</b>	<b>0,8</b>	<b>-1,3</b>

Fullstendig beregningstabell for reproduserbarhet (CV) og nøyaktighet (avvik) for kontrollene (QC) for likarbazepin over tre dager.

Datafil	Likarbazepin	QC1 (µmol/L)	QC2 (µmol/L)	QC3 (µmol/L)
0324KKOZ_dag1	Serie1	5	41	153,7
0328KKOZ_dag2	Serie2	5	41,2	153,8
0330KKOZ_dag3	Serie3	4,9	42,8	151,5
	Gjennomsnitt	<b>5</b>	<b>42</b>	<b>153</b>
	SD	0,06	0,99	1,30
	%CV	<b>1,2</b>	<b>2,4</b>	<b>0,8</b>
	Teoretisk verdi	5	40	150
	Nøyaktighet (%)	99,3	104,2	102,0
	<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>-0,7</b>	<b>4,2</b>	<b>2,0</b>

Fullstendig beregningstabell for reproduserbarhet (CV) og nøyaktighet (avvik) for kontrollene (QC) for Zonisamid over tre dager.

Datafil	Zonisamid	QC1 (µmol/L)	QC2 (µmol/L)	QC3 (µmol/L)
0324KKOZ_dag1	Serie1	8	80,4	200,5
0328KKOZ_dag2	Serie2	7,8	80,1	198,7
0330KKOZ_dag3	Serie3	8	84	193,5
	Gjennomsnitt	<b>8</b>	<b>82</b>	<b>198</b>
	SD	0,12	2,17	3,64
	%CV	<b>1,5</b>	<b>2,7</b>	<b>1,8</b>
	Teoretisk verdi	8	80	200
	Nøyaktighet (%)	99,2	101,9	98,8
	<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>-0,8</b>	<b>1,9</b>	<b>-1,2</b>



## Vedlegg 5: Z-verdier for SLP-er

Fullstendig beregningstabell for Z-verdier til SLP-er for hvert antiepileptika dag 1.

0324KKOZ_dag1						Valideringsdata	
Analytt	Kode	Runde	Spiket verdi (µmol/L)	Assigned value (µmol/L)	SDPA	Målt verdi (µmol/L)	Z-verdi
Karbamazepin	TD1A	215	15,32	16,50	1,764	16,7	0,1
	TD1B	214	45,62	52,00	3,773	52,2	0,1
	TD1C	214	152,56	159,97	14,523	182,5	1,6
Karbamazepinepoksid	TD1A	215	4,20	4,20	0,580	4,3	0,2
	TD1B	214	10,34	11,09	1,182	10,8	-0,2
	TD1C	214	98,85	98,20	8,805	77,2	-2,4
Likarbazepin	AE1	209	27,1	28,7	2,690	28,7	0,0
	AE1	210	64,7	68,2	5,204	67,9	-0,1
Zonisamid	AE2	209	214,94	226,10	20,64	208,2	-0,9
	AE2	210	25,54	27,33	3,846	24,3	-0,8
	AE2	212	146,42	160,23	13,597	141,3	-1,4
	AE2	213	94,20	97,15	8,225	89,1	-1,0

Fullstendig beregningstabell for Z-verdier til SLP-er for hvert antiepileptika dag 2.

0328KKOZ_dag2						Valideringsdata	
Analytt	Kode	Runde	Spiket verdi (µmol/L)	Assigned value (µmol/L)	SDPA	Målt verdi (µmol/L)	Z-verdi
Karbamazepin	TD1C	217	89,89	92,26	6,965	91,2	-0,2
	TD1C	218	24,80	26,36	2,246	26,1	-0,1
	TD1A	216	9,78	10,58	1,502	10,7	0,1
	TD1A	218	11,93	12,70	1,593	12,5	-0,1
	TD1B	216	78,54	81,68	6,032	81,6	0,0
	TD1C	219	77,95	80,00	5,89	79,2	-0,1
Karbamazepinepoksid	TD1C	217	65,91	64,75	5,878	52	-2,2
	TD1C	218	4,24	4,38	0,595	4	-0,6
	TD1A	216	1,82	1,80	0,370	1,9	0,3
	TD1A	218	1,86	1,98	0,385	2	0,1
	TD1B	216	36,62	35,93	3,356	30,1	-1,7
	TD1C	219	36,50	36,31	3,389	29	-2,2
Likarbazepin	AE1	216	155,3	157,0	13,857	159,1	0,2
	AE1	217	18,4	19,0	2,198	18,8	-0,1
	AE1	218	47,9	51,9	4,068	52,5	0,1
	AE1	219	138,6	144,8	12,421	146	0,1
	AE1	215	36,1	37,7	3,191	37	-0,2
Zonisamid	AE2	217	166,40	176,67	15,218	154,7	-1,4
	AE2	218	96,80	102,00	8,591	89,2	-1,5
	AE2	219	44,49	46,58	4,889	41,5	-1,0

Fullstendig beregningstabell for Z-verdier til SLP-er for hvert antiepileptika dag 3.

0330KKOZ_dag3						Valideringsdata			
Analytt	Kode	Runde	Spiket verdi (µmol/L)	Assigned value (µmol/L)	SDPA	Målt verdi (µmol/L)	Z-verdi	Målt verdi på LC-MSMS F	Z-verdi LC-MSMS F
Karbamazepin	TD1A	219	43,08	46,97	3,443	45,8	-0,3	45,4	-0,5
	TD1B	215	34,15	37,20	2,844	36,5	-0,2	36,2	-0,4
	TD1B	217	9,18	10,16	1,484	10,3	0,1	10,1	0,0
	TD1B	218	98,05	101,57	7,841	102,6	0,1	100,7	-0,1
	TD1C	215	78,16	81,25	5,996	79,4	-0,3	79,9	-0,2
	TD1C	216	21,46	23,32	2,091	23,4	0,0	22,9	-0,2
	TD1C	214	152,56	159,97	14,523	160	0,0	158,2	-0,1
	TD1C2	214	152,56	159,97	14,523	158,6	-0,1	156,3	-0,3
	TD1A	219	9,71	10,27	1,110	9,2	-1,0	9,1	-1,1
Karbamazepinepoksid	TD1B	215	9,43	9,45	1,039	8,7	-0,7	8,9	-0,5
	TD1B	217	4,20	4,40	0,597	4,3	-0,2	4,2	-0,3
	TD1B	218	64,05	65,00	5,900	48,3	-2,8	53,1	-2,0
	TD1C	215	36,54	36,30	3,388	28,5	-2,3	30,2	-1,8
	TD1C	216	5,51	5,60	0,207	5,1	-2,4	5	-2,9
	TD1C	214	98,85	98,20	8,805	65,7	-3,7	72,5	-2,9
	TD1C2	214	98,85	98,20	8,805	64,4	-3,8	72,9	-2,9
	AE1	212	154,7	160,4	14,282	159,6	-0,1	156,8	-0,3
Likarbazepin	AE1	213	54,4	57,4	4,432	57,5	0,0	58,3	0,2
	AE1	214	83,1	84,4	6,470	84,4	0,0	84,6	0,0
	AE2	214	60,37	64,74	5,988	57,6	-1,2	57,8	-1,2
Zonisamid	AE2	215	112,02	118,28	9,876	106,6	-1,2	106,9	-1,2
	AE2	216	188,83	202,39	17,936	176,1	-1,5	179,8	-1,3

## Vedlegg 6: Matrikseffekter for antiepileptika

Fullstendige beregningstabeller for matrikseffekt med og uten korrigering med internstandard til laveste kontroll (QC1) og høyeste kontroll (QC3) for karbamazepin og karbamazepinepoksid.

RATIO				
QC1				
5,0 µmol/L				
Karbamazepin	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	160840	128672	1826686	1486533
Parallell2	159791	137164	1834560	1545585
Parallell3	159919	143255	1827625	1581948
Parallell4		151020		1741337
Parallell5		151044		1686961
Parallell6		146343		1719707
Gjennomsnitt	160183	142916,3333	1829624	1627012
STDAV	572,2799	8712,9271	4300,6942	103587,5679
% CV	0,4	6,1	0,2	6,4
ME (%)		89	ME-korrigert (%)	100,33

RATIO				
QC3				
80 µmol/L				
Karbamazepin	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	1461494	1408510	1296084	1176103
Parallell2	1463611	1430120	1298953	1254350
Parallell3	1465731	1469203	1298255	1253371
Parallell4		1469517		1296629
Parallell5		1687627		1488382
Parallell6		1425965		1205963
Gjennomsnitt	1463612,0000	1481823,6667	1297764,0000	1279133,0000
STDAV	2118,5002	103763,2891	1496,1955	110759,3441
% CV	0,1	7,0	0,1	8,7
ME (%)		101	ME-korrigert (%)	102,72

RATIO				
QC1				
0,5 µmol/L				
Karbamazepinepoksid	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	51284	36803	302147	219682
Parallell2	50621	38950	301306	232093
Parallell3	50970	42165	302283	246556
Parallell4		46009		277847
Parallell5		45212		271535
Parallell6		45431		280329
Gjennomsnitt	50958,3333	42428,3333	301912,0000	254673,6667
STDAV	331,6539	3831,4097	529,1985	25611,3405
% CV	0,7	9,0	0,2	10,1
ME (%)		83	ME-korrigert (%)	98,70

RATIO				
QC3				
15 µmol/L				
Karbamazepinepoksid	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	1327858	1245521	240870	217757
Parallell2	1327185	1282617	240384	230945
Parallell3	1333147	1326074	241232	231728
Parallell4		1334337		241218
Parallell5		1612770		281226
Parallell6		1294724		225239
Gjennomsnitt	1329397	1349341	240829	238019
STDAV	3265,3	132947,4	425,5	22541,4
% CV	0,2	9,9	0,2	9,5
ME (%)		102	ME-korrigert (%)	102,70

Fullstendige beregningstabeller for matrikseffekt med og uten korrigering med internstandard til laveste kontroll (QC1) og høyeste kontroll (QC3) for likarbazepin og zonisamid.

RATIO				
QC1	5,0 µmol/L			
Likarbazepin	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	130768	91393	648828	469991
Parallell2	129799	97257	652659	494102
Parallell3	129577	104839	649302	514461
Parallell4		112241		575262
Parallell5		114572		566181
Parallell6		112268		585154
Gjennomsnitt	130048,0000	105428,3333	650263,0000	534191,8333
STDAV	633,3411	9390,5132	2088,4877	47802,6261
% CV	0,5	8,9	0,3	8,9
ME (%)	81		ME-korrigert (%)	98,68

RATIO				
QC3	150 µmol/L			
Likarbazepin	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	2446626	2249632	407478	359083
Parallell2	2482929	2329227	410758	381212
Parallell3	2459860	2407738	409091	386119
Parallell4		2404199		397209
Parallell5		2797415		454131
Parallell6		2365072		376408
Gjennomsnitt	2463138,3333	2425547,1667	409109,0000	392360,3333
STDAV	18372,1951	191279,6708	1640,0741	32754,3043
% CV	0,7	7,9	0,4	8,3
ME (%)	98		ME-korrigert (%)	102,68

RATIO				
QC1	8,0 µmol/L			
Zonisamid	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	314333	389912	797913	971230
Parallell2	313201	364793	794294	901054
Parallell3	310948	339525	795141	819769
Parallell4		328312		829775
Parallell5		314990		779920
Parallell6		296216		768698
Gjennomsnitt	312827,3333	338958,0000	795782,6667	845074,3333
STDAV	1723,1588	33996,3520	1892,9058	77462,0375
% CV	0,6	10,0	0,2	9,2
ME (%)	108		ME-korrigert (%)	102,03

RATIO				
QC3	200 µmol/L			
Zonisamid	Sett 1 u/matriks DIR-løsning	Sett 2 m/matriks	IS-areal DIR	IS-areal
Parallell1	5239135	4659125	572705	491733
Parallell2	5281525	4880866	575378	528684
Parallell3	5270009	5024455	578050	531015
Parallell4		5101741		555503
Parallell5		6230929		662034
Parallell6		4974326		519002
Gjennomsnitt	5263556,33	5145240,33	575377,67	547995,17
STDAV	21919,30	553283,79	2672,50	59545,79
% CV	0,4	10,8	0,5	10,9
ME (%)	98		ME-korrigert (%)	102,64

## Vedlegg 7: Robusthet for QC2

Fullstendig beregningstabell for drift (robusthet) til kontroll 2 (QC2) for karbamazepin over tre dager.

Antiepileptika	Datafil		
Karbamazepin	0324KKOZ_dag1	0328KKOZ_dag2	0330KKOZ_dag3
Injeksjoner mellom	40	42	42
QC2 40 (µmol/L)	40,4	40,6	41,9
QC2 drift 40 (µmol/L)	40,8	40,8	42,5
<b>Avvik (%)</b>	<b>0,99</b>	<b>0,49</b>	<b>1,43</b>
QC2 Areal	771184	493292	974529
QC2 drift areal	759209	468887	821996
<b>Avvik (%)</b>	<b>-1,55</b>	<b>-4,95</b>	<b>-15,65</b>

Fullstendig beregningstabell for drift (robusthet) til kontroll 2 (QC2) for karbamazepinepoxid over tre dager.

Antiepileptika	Datafil		
Karbamazepinepoxid	0324KKOZ_dag1	0328KKOZ_dag2	0330KKOZ_dag3
Injeksjoner mellom	40	42	42
QC2 40 (µmol/L)	4	4	4,1
QC2 drift 40 (µmol/L)	4	4	4
<b>Avvik (%)</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	<b>-2,44</b>
QC2 Areal	309117	196421	354523
QC2 drift areal	306238	192468	302861
<b>Avvik (%)</b>	<b>-0,93</b>	<b>-2,01</b>	<b>-14,57</b>

Fullstendig beregningstabell for drift (robusthet) til kontroll 2 (QC2) for likarbazepin over tre dager.

Antiepileptika	Datafil		
Likarbazepin	0324KKOZ_dag1	0328KKOZ_dag2	0330KKOZ_dag3
Injeksjoner mellom	40	42	42
QC2 40 (µmol/L)	41	41,2	42,8
QC2 drift 40 (µmol/L)	41	41,4	42,2
<b>Avvik (%)</b>	<b>0,00</b>	<b>0,49</b>	<b>-1,40</b>
QC2 Areal	800935	567417	956909
QC2 drift areal	805398	560309	844863
<b>Avvik (%)</b>	<b>0,56</b>	<b>-1,25</b>	<b>-11,71</b>

Fullstendig beregningstabell for drift (robusthet) til kontroll 2 (QC2) for zonisamid over tre dager.

Antiepileptika	Datafil		
Zonisamid	0324KKOZ_dag1	0328KKOZ_dag2	0330KKOZ_dag3
Injeksjoner mellom	40	42	42
QC2 40 (µmol/L)	80,4	80,1	84
QC2 drift 40 (µmol/L)	79,6	80,2	82,5
<b>Avvik (%)</b>	<b>-1,00</b>	<b>0,12</b>	<b>-1,79</b>
QC2 Areal	1709320	1321216	1853707
QC2 drift areal	1665017	1306167	1748062
<b>Avvik (%)</b>	<b>-2,59</b>	<b>-1,14</b>	<b>-5,70</b>

## Vedlegg 8: IS-recovery for antiepileptika

Fullstendig tabell med IS-recovery for hvert antiepileptika over tre dager. Verdier markert i grønt er maksimums- og minimumsverdier for hver IS.

IS Karbamazepin-d10	IS karbamazepinepoxid-d8	IS Likarbazepin-d3	IS Zonizamid-d4
14,4	11,3	19,4	8,7
15,7	10,9	18,7	10,2
8	5,2	10,7	7,4
-6,1	-0,5	-2,8	-4,7
-17,7	-15,6	-26,7	-12,9
14,8	8,2	15,8	13,1
11,2	7,4	13,9	12,1
-5,2	2	0,9	-1,4
-15,3	-13,2	-21,8	-11,7
15,8	9,1	18,2	15,4
16,7	8,8	16,7	12,8
-4	2,9	13,5	12,9
-7,9	3,5	15	13
0,5	2	11	5,6
-3,6	6,3	17,5	16,4
3,6	8	18,1	15,6
-7,2	1,5	15,7	14,3
-1,1	6,1	16,9	12,9
-3,4	6,7	16,5	15,8
0,5	8,2	18,9	16,4
-7,4	4,3	17,4	14,6
5	15,8	30,2	17,6
-10,1	4,9	19	11,3
-26	-15,2	12,6	26,9
16,2	9,6	17,1	15,8
12,4	0,2	-2,6	13,1
15,6	-0,8	-4	8,6
14,9	-2,8	-8,7	14,1
14,4	-3,3	-9,9	13,6
13,7	0,9	-1,1	11,6
14,6	-1,2	-9,2	14,6
13,1	0,7	-1,5	14,3
8	-2,4	-2,7	-0,7
13	-1,8	-4	11,2
14,9	3,3	7	13,7
11,7	-0,2	-5,5	13

IS Karbamazepin-d10 (fortsettelse fra forrige side)	IS karbamazepinepoksid-d8 (fortsettelse fra forrige side)	IS Likarbazepin-d3 (fortsettelse fra forrige side)	IS Zonizamid-d4 (fortsettelse fra forrige side)
13,3	9,1	17,9	-5,2
14,6	-2,1	-8,9	-11
12,7	6,9	18,2	3,6
14	10,2	19,7	6,3
14	8	18,3	-10,7
13,3	7,9	18,6	-12,2
11,1	6	16,3	-14,7
11,3	6	17	-5,7
14,8	8,4	18,9	-13
13	15,3	18,8	5,2
12,3	16,5	18,5	-10,9
-7,6	-0,9	1,5	-3,1
19,7	10,4	15,6	10,7
19,9	10,5	15,1	10,5
6,6	6,9	11,5	5
-9,3	-0,8	-1,3	-2,8
-17,2	-16,6	-25,3	-12,7
10,2	4,8	13,2	14,4
10,5	8,6	15,4	15,6
-6,4	-1,3	1,1	0,8
-14,7	-13,3	-20,2	-9,4
-1,1	1,9	11,9	16,8
-7,3	0,8	11	16,4
-6,8	-0,9	9,1	12,5
-1,9	1,8	13,8	15,6
-9,2	0,5	12,8	10,6
-8,6	1,5	12,3	15,9
-10,4	-2,2	10,7	15
-8,3	1,9	18	-0,4
-8,3	0,2	10,8	17,9
3,2	3,2	14,7	19
-19,2	-8,9	11,8	-1,9
-6	0,5	16,1	0,7
0,3	9,5	17,8	38,8
2	16,3	23,8	46
-18,9	-8,1	9	0,5
-17,6	-7,9	11,1	30
7,5	-3,7	-4,3	19
6,4	-3,1	-2,7	19,8
6,4	-2,1	1,5	18,6
9	-4	-8,6	7,9

IS Karbamazepin-d10 (fortsettelse fra forrige side)	IS karbamazepinepoksid-d8 (fortsettelse fra forrige side)	IS Likarbazepin-d3 (fortsettelse fra forrige side)	IS Zonizamid-d4 (fortsettelse fra forrige side)
6,5	-7,7	-11,5	17,8
3,3	-3,9	-1,5	3,7
5,2	-2,2	5,7	12,9
6,4	-6,3	-12,7	17,4
5,9	-3,1	-2,9	19,8
5,5	-3,7	-3,5	19
5,8	-13,1	-22,2	17,1
5,5	-0,2	6,2	16
2,8	-6	-5	18,2
4,7	-12,4	-22,1	16,3
5,7	-3,2	-0,8	17,1
4,1	0,7	9,5	-4
-0,7	-1,6	8,1	3,6
6,6	2,5	11,1	-10
6,3	2,5	12,6	15,8
8,5	1,9	13,8	5,1
4,9	2,1	12,3	0,5
2,8	2,4	11,6	-0,9
5,6	8,9	11,6	-9,7
6	2,7	12,3	-2,9
3,7	0,2	11,2	4,4
-11,5	-2,8	-0,7	-0,4
24,7	19,1	24,1	5,6
19,8	10,1	14,4	6,3
9,7	3,4	8,2	4
-7,4	2,7	3,8	0,2
-22,2	-16,1	-26,4	-10,5
13,7	4,6	14	15,7
9,9	2,4	10,6	13,6
-11,5	-7,8	-5,6	-1,4
-22,4	-17,5	-24,8	-7
-22,1	-13,5	5,4	30,7
-0,5	-2,7	8,7	19,6
8,7	-3,3	7,2	14,6
-1,8	-5,4	6,4	14,4
-18,6	-8,7	5,4	15,2
-15,2	-10	1,3	13,2
-14,3	-5,5	7,2	19,6
-15,4	-10,1	5,5	3,8
-19,9	-7,5	5,1	18,8
-14,8	-8,8	5,6	13,4

IS Karbamazepin-d10 (fortsettelse fra forrige side)	IS karbamazepinepoksid-d8 (fortsettelse fra forrige side)	IS Likarbazepin-d3 (fortsettelse fra forrige side)	IS Zonizamid-d4 (fortsettelse fra forrige side)
-20,3	-3,9	15,7	25
-18,4	-11,3	6,4	26,2
-9,3	-6,9	14	20,8
-35,7	-27,5	-5,7	20,8
-29,7	-19,7	1,6	40,3
-16,6	-10	8,1	22
-40,7	-29,5	-0,5	35,6
-40,4	-29,7	-1,3	33,9
-1,4	-16,1	-15,6	14,1
-2,4	-9,8	-1,2	10,8
-2	-16,6	-18,6	15,6
-4,4	-17,9	-16,5	13,1
-7,1	-22,4	-23,8	5,7
-6,5	-12,3	-0,2	10,2
-2,2	-19	-21	16,1
-4,8	-18,8	-15,2	11,8
-1,2	-18,8	-18	15,3
-3,2	-17,6	-14,9	14,1
-2,8	-23,6	-31,9	13,6
-4,6	-19,3	-17,6	8,1
-4,2	-20	-21,5	10,4
-5,5	-14,2	-1,5	5,9
-4,5	-2,9	3,5	-10,9
-4,7	-12,7	-0,6	-7,7
-4,3	-13,7	-0,6	-13,2
-3,4	-11,5	-0,1	-2,7
-3,8	-13,3	-0,4	-3,6
-5,1	-8,4	0,1	-2,1
-5,2	-12	-2,5	-7,7
-6,2	-13	-1,6	-16
-26,4	-21,1	-15,5	-5,2
-40,7	-31,2	-42,6	-21
24,7	19,1	30,2	46



## Vedlegg 9: Samkjøring mellom Xevo TQ-XS og Xevo TQ-S

Fullstendig beregningstabell for beregning av avvik (%) mellom Xevo TQ-XS (på instrumentet LC-MSMS K) og Xevo TQ-S (på instrumentet LC-MSMS F) for karbamazepin og karbamazepineposkid over tre dager. Røde felt er negative for analytten.

Nr.	Karbamazepin				Nr.	Karbamazepineposkid			
	Prøve ID	LC-MSMS F (µmol/L)	LC-MSMS K (µmol/L)	Avvik (%)		Prøve ID	LC-MSMS F (µmol/L)	LC-MSMS K (µmol/L)	Avvik (%)
1	KBMZ 1	30,6	32,6	-6,1	1	KBMZ 1	5,7	5,6	1,8
2	KBMZ 2	44,4	46,6	-4,7	2	KBMZ 2	4,9	4,8	2,1
3	KBMZ 3	11	11,8	-6,8	3	KBMZ 3	1,1	1,1	0,0
4	KBMZ 4	36,1	37,6	-4,0	4	KBMZ 4	8	7,9	1,3
5	KBMZ 5	17,7	18,8	-5,9	5	KBMZ 5	2,5	2,5	0,0
6	KBMZ 6	45,9	47,8	-4,0	6	KBMZ 6	11,9	11,6	2,6
7	KBMZ 7	25,8	27,1	-4,8	7	KBMZ 7	2,8	2,9	-3,4
8	KBMZ 8	32,8	34,1	-3,8	8	KBMZ 8	4,4	4,3	2,3
9	KBMZ 9	25,4	27	-5,9	9	KBMZ 9	2,8	2,8	0,0
10	KBMZ 10	43,2	45,8	-5,7	10	KBMZ 10	8,3	8,3	0,0
11	KBMZ 11	15,4	15	2,7	11	KBMZ 11	1,1	1,1	0,0
12	KBMZ 12	30,1	29	3,8	12	KBMZ 12	3,5	3,4	2,9
13	KBMZ 13	29,5	28,4	3,9	13	KBMZ 13	2,4	2,3	4,3
14	KBMZ 14	21,2	20,4	3,9	14	KBMZ 14	1,5	1,5	0,0
15	KBMZ 15	41,9	40,6	3,2	15	KBMZ 15	4,4	4,3	2,3
16	KBMZ 16	39,1	38,6	1,3	16	KBMZ 16	7,2	6,9	4,3
17	KBMZ 17	42,1	40,8	3,2	17	KBMZ 17	10,1	9,6	5,2
18	KBMZ 18	36,7	35,9	2,2	18	KBMZ 18	8,7	8,7	0,0
19	KBMZ 19	33,7	32,7	3,1	19	KBMZ 19	5,4	5,2	3,8
20	KBMZ 20	8,1	7,9	2,5	20	KBMZ 20	0,5	0,5	0,0
21	KBMZ 21	81,7	81,6	0,1	21	KBMZ 21	30,6	29	5,5
22	KBMZ 22	16,5	17	-2,9	22	KBMZ 22	2,2	2,3	-4,3
23	KBMZ 23				23	KBMZ 23			
24	KBMZ 24	15,1	15,3	-1,3	24	KBMZ 24	1,3	1,3	0,0
25	KBMZ 25	51	51,5	-1,0	25	KBMZ 25	7,4	7,5	-1,3
26	KBMZ 26	27,6	28,9	-4,5	26	KBMZ 26	3,8	3,7	2,7
27	KBMZ 27	36,1	36,9	-2,2	27	KBMZ 27	4,7	4,7	0,0
28	KBMZ 28	29	30,4	-4,6	28	KBMZ 28	16,8	16,2	3,7
29	KBMZ 29	48	49,1	-2,2	29	KBMZ 29	6	5,9	1,7
30	KBMZ 30	27,7	28,5	-2,8	30	KBMZ 30	3,2	3,2	0,0
31	219 TD1A	45,4	45,8	-0,9	31	219 TD1A	9,1	9,2	-1,1
32	215 TD1B	36,2	36,5	-0,8	32	215 TD1B	8,9	8,7	2,3
33	217 TD1B	10,1	10,3	-1,9	33	217 TD1B	4,2	4,3	-2,3
34	218 TD1B	100,7	102,6	-1,9	34	218 TD1B	53,1	48,3	9,9
35	215 TD1C	79,9	79,4	0,6	35	215 TD1C	30,2	28,5	6,0
36	216 TD1C	22,9	23,4	-2,1	36	216 TD1C	5	5,1	-2,0
37	214 TD1C	158,2	160	-1,1	37	214 TD1C	72,5	65,7	10,4
38	214 TD1C2	156,3	158,6	-1,5	38	214 TD1C2	72,9	64,4	13,2
39	217 TD1C	90,4	91,2	-0,9	39	217 TD1C	52,5	52	1,0
40	218 TD1C	26,9	26,1	3,1	40	218 TD1C	4	4	0,0
41	216 TD1A	10,7	10,7	0,0	41	216 TD1A	1,8	1,9	-5,3
42	218 TD1A	12,8	12,5	2,4	42	218 TD1A	1,8	2	-10,0
43	216 TD1B	79,3	81,6	-2,8	43	216 TD1B	31,4	30,1	4,3
44	219 TD1C	79,1	79,2	-0,1	44	219 TD1C	30,3	29	4,5
45	215 TD1A	15,6	16,7	-6,6	45	215 TD1A	4	4,3	-7,0
46	214 TD1B	49,5	52,2	-5,2	46	214 TD1B	10,9	10,8	0,9
47	214 TD1C	165,2	182,5	-9,5	47	214 TD1C	73,2	77,2	-5,2

Fullstendig beregningstabell for beregning av avvik (%) mellom Xevo TQ-XS (på instrumentet LC-MSMS K) og Xevo TQ-S (på instrumentet LC-MSMS F) for likarbazepin og zonisamid over tre dager. Rødt felt er negativt for analytten.

Nr.	Likarbazepin				Nr.	Zonisamid			
	Prøve ID	LC-MSMS F (µmol/L)	LC-MSMS K (µmol/L)	Avvik (%)		Prøve ID	LC-MSMS F (µmol/L)	LC-MSMS K (µmol/L)	Avvik (%)
1	LIKRB 1	5	5,1	-2,0	1	ZONI 1	78,8	74,4	5,9
2	LIKRB 2	47,1	48,8	-3,5	2	ZONI 2	34,8	34,5	0,9
3	LIKRB 3	61,6	62,7	-1,8	3	ZONI 3	26,6	26,1	1,9
4	LIKRB 4	82,3	83,6	-1,6	4	ZONI 4	115,3	110,4	4,4
5	LIKRB 5	86,9	89	-2,4	5	ZONI 5	70,6	65,2	8,3
6	LIKRB 6	50,8	51,5	-1,4	6	ZONI 6	70,4	64,9	8,5
7	LIKRB 7	85,6	88	-2,7	7	ZONI 7	87,5	86,3	1,4
8	LIKRB 8	53,1	54,2	-2,0	8	ZONI 8	93	92,7	0,3
9	LIKRB 9	39,9	42,4	-5,9	9	ZONI 9	30,5	30,6	-0,3
10	LIKRB 10	56,3	57,8	-2,6	10	ZONI 10	180,6	178,7	1,1
11	LIKRB 11	58,9	58,1	1,4	11	ZONI 11	6	6	0,0
12	LIKRB 12	49,3	50,2	-1,8	12	ZONI 12	34,1	34,3	-0,6
13	LIKRB 13	28,9	29,2	-1,0	13	ZONI 13	68,2	68,2	0,0
14	LIKRB 14	77,7	76,5	1,6	14	ZONI 14	39,6	38,7	2,3
15	LIKRB 15	87,6	86	1,9	15	ZONI 15	25,2	25	0,8
16	LIKRB 16	35,5	35,8	-0,8	16	ZONI 16	147,5	142,8	3,3
17	LIKRB 17	11,3	11,4	-0,9	17	ZONI 17	71,8	67,7	6,1
18	LIKRB 18	94,8	95,1	-0,3	18	ZONI 18	171,3	168,5	1,7
19	LIKRB 19	51,8	50,6	2,4	19	ZONI 19	75,6	75,4	0,3
20	LIKRB 20	48,3	48,6	-0,6	20	ZONI 20	70,8	70	1,1
21	LIKRB 21	69,7	68,5	1,8	21	214 AE2	57,8	57,6	0,3
22	LIKRB 22	11,2	11,3	-0,9	22	215 AE2	106,9	106,6	0,3
23	LIKRB 23	83,5	81,1	3,0	23	216 AE2	179,8	176,1	2,1
24	LIKRB 24	61,6	60,6	1,7	24	217 AE2	155,6	154,7	0,6
25	LIKRB 25	88,6	85,8	3,3	25	218 AE2	88,4	89,2	-0,9
26	LIKRB 26				26	219 AE2	41,9	41,5	1,0
27	LIKRB 27	86,3	86,9	-0,7	27	213 AE2	90,3	89,1	1,3
28	LIKRB 28	54,4	53,5	1,7	28	209 AE2	206	208,2	-1,1
29	LIKRB 29	76,3	75,1	1,6	29	210 AE2	24,3	24,3	0,0
30	LIKRB 30	58	57	1,8	30	212 AE2	141,9	141,3	0,4
31	212 AE1	156,8	159,6	-1,8					
32	213 AE1	58,3	57,5	1,4					
33	214 AE1	84,6	84,4	0,2					
34	216 AE1	160,4	159,1	0,8					
35	217 AE1	19,4	18,8	3,2					
36	218 AE1	52,9	52,5	0,8					
37	219 AE1	147,7	146	1,2					
38	215 AE1	37	37	0,0					
39	209 AE1	27,5	28,7	-4,2					
40	210 AE1	66,1	67,9	-2,7					

## Vedlegg 10: Passing and Bablok regresjonsanalyse

Resultater fra Passing and Bablok regresjonsanalyse for karbamazepin og karbamazepinepoksid, likarbazepin og zonisamid..

### Passing and Bablok regression karbamazepin

Variable X	LC_MSMS_F	
Variable Y	LC_MSMS_K	
Sample size	46	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	8,1000	7,9000
Highest value	165,2000	182,5000
Arithmetic mean	45,2739	46,2391
Median	34,9000	35,0000
Standard deviation	37,7778	39,3469
Standard error of the mean	5,5700	5,8014

#### Regression Equation

$$y = -0,0105866 + 1,016713 x$$

#### Systematic differences

Intercept A	-0,1059
95% CI	-0,3736 to 0,4481

#### Proportional differences

Slope B	1,0167
95% CI	1,0038 to 1,0315

#### Random differences

Residual Standard Deviation (RSD)	1,7164
± 1.96 RSD Interval	-3,3642 to 3,3642

#### Linear model validity

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,86)
--------------------------	--

#### Spearman rank correlation coefficient

Correlation coefficient	0,997
Significance level	P<0,0001
95% CI	0,994 to 0,998

### Passing and Bablok regression karbamazepinepoksid

Variable X	LC_MSMS_F	
Variable Y	LC_MSMS_K	
Sample size	46	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,5000	0,5000
Highest value	73,2000	77,2000
Arithmetic mean	13,8913	13,3609
Median	5,2000	5,1500
Standard deviation	19,9121	18,8935
Standard error of the mean	2,9359	2,7857

#### Regression Equation

$$y = 0,108163 + 0,959184 x$$

#### Systematic differences

Intercept A	0,1082
95% CI	0,02245 to 0,1974

#### Proportional differences

Slope B	0,9592
95% CI	0,9474 to 0,9796

#### Random differences

Residual Standard Deviation (RSD)	1,1195
± 1.96 RSD Interval	-2,1941 to 2,1941

#### Linear model validity

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,39)
--------------------------	--

#### Spearman rank correlation coefficient

Correlation coefficient	0,999
Significance level	P<0,0001
95% CI	0,999 to 1,000

### Passing and Bablok regression likarbazepin

Variable X	LC_MSMS_F	
Variable Y	LC_MSMS_K	
Sample size	39	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	5,0000	5,1000
Highest value	160,4000	159,6000
Arithmetic mean	64,4359	64,5103
Median	58,3000	57,8000
Standard deviation	35,2845	35,1582
Standard error of the mean	5,6500	5,6298

#### Regression Equation

$$y = 0,373742 + 0,989899 x$$

#### Systematic differences

Intercept A	0,3737
95% CI	-0,02157 to 1,1237

#### Proportional differences

Slope B	0,9899
95% CI	0,9768 to 1,0067

#### Random differences

Residual Standard Deviation (RSD)	1,0231
± 1.96 RSD Interval	-2,0053 to 2,0053

#### Linear model validity

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,77)
--------------------------	--

#### Spearman rank correlation coefficient

Correlation coefficient	0,995
Significance level	P<0,0001
95% CI	0,990 to 0,997

### Passing and Bablok regression Zonisamid

Variable X	LC_MSMS_F	
Variable Y	LC_MSMS_K	
Sample size	30	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	6,0000	6,0000
Highest value	206,0000	208,2000
Arithmetic mean	86,3700	84,9667
Median	73,7000	72,2000
Standard deviation	54,0280	53,6508
Standard error of the mean	9,8641	9,7952

#### Regression Equation

$$y = -0,0434452 + 0,992006 x$$

#### Systematic differences

Intercept A	-0,04345
95% CI	-0,5500 to 0,4368

#### Proportional differences

Slope B	0,9920
95% CI	0,9815 to 1,0000

#### Random differences

Residual Standard Deviation (RSD)	1,5182
± 1.96 RSD Interval	-2,9757 to 2,9757

#### Linear model validity

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,34)
--------------------------	--

#### Spearman rank correlation coefficient

Correlation coefficient	0,996
Significance level	P<0,0001
95% CI	0,991 to 0,998