

Maren Kvilten  
Marte Andresen Skjelle  
Synne Thommesen

# Tilleggsvalidering av GC-MS metode for kvantifisering av THC i fullblod ved bruk av standardrekke i serum

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Trine Naalsund Andreassen, Ingunn Sletten, Margareth  
Nupen  
Mai 2023



Maren Kvilten  
Marte Andresen Skjelle  
Synne Thommesen

# **Tilleggsvalidering av GC-MS metode for kvantifisering av THC i fullblod ved bruk av standardrekke i serum**

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag  
Veileder: Trine Naalsund Andreassen, Ingunn Sletten, Margareth  
Nupen  
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden



## Forord

Denne rapporten er skrevet som avsluttende hovedprosjekt for bachelorutdanningen ved Institutt for Bioingeniørfag ved NTNU i Trondheim. Målet med oppgaven var å undersøke om standardkurver i serum kan benyttes til kvantifisering av THC i fullblodsprøver ved bruk av GC-MS. Oppgaven er gitt av Seksjon for analytisk forskning og utvikling (FoU) ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St. Olavs hospital i Trondheim. AKF har ansvaret for analyse og tolkning av prøvesvar i forbindelse med rus- og legemiddelanalyse.

Opgaven ble gjennomført på laboratoriet tilhørende AFK i perioden 8.mars 2023 til 20. mai 2023. Oppgaven er skrevet basert på kunnskap opparbeidet under studieforløpet, samt kunnskap tilegnet under bachelorperioden.

Vi ønsker å rette en takk til Trine Naalsund Andreassen, kjemiker ved AKF, for god faglig veiledning under oppgaven. Vi vil også takke Ingunn Sletten, bioingeniør ved AKF, for praktisk veiledning, opplæring og tålmodighet på laboratoriet. Vi ønsker også å rette en takk til øvrige ansatte ved AKF for en hyggelig prosjektperiode, og en ekstra takk til Elin Nilssen, fagansvarlig bioingeniør for GC, for hjelp når instrumentene ikke var så hjelpsomme. Til slutt vil vi takke vår prosessveileder Margareth Nupen, førstelektor ved Institutt for Bioingeniørfag ved NTNU, for hjelp i skriveprosessen.

Maren Kvilten

Maren Kvilten

Marte A. Skjelle

Marte Andresen Skjelle

Synne Thommesen

Synne Thommesen

*Trondheim 16.mai 2023*

## Sammendrag

I denne oppgaven ble det gjennomført en tilleggervalidering av metode for kvantifisering av THC i fullblod. THC er et av virkestoffene i cannabis og bestemmes i post mortem blod ved analyse på gasskromatografi med massespektrometri (GC-MS). Formålet med oppgaven var å undersøke om det er mulig å benytte standardrekke i serum for måling av THC i fullblod, da det vil være mindre ressurskrevende enn å bruke fullblod. Det ble også gjennomført en holdbarhetsundersøkelse for å se om tin og frys sykluser påvirker THC-konsentrasjonen.

Metodens prøveopparbeidelse var væske-væske ekstraksjon, fast-fase ekstraksjon og derivatisering, og analyseprinsippet var GC-MS. Det ble gjennomført en forenklet validering, som innebar undersøkelse av laveste kvantifiseringsgrense, reproduserbarhet, signalstyrke og en metodesammenlikning mellom de to ulike standardkurvene. Resultater for standarder, kontroller og prøver ble vurdert opp mot Avdeling for klinisk farmakologi sine akseptkriterier.

Resultatene viste at krav for laveste kvantifiseringsgrense, reproduserbarhet, nøyaktighet og kurvetilpasning, på henholdsvis  $S/N \geq 30$ ,  $CV \leq 15\%$  og  $\text{avvik} \leq 20\%$ , ble innfridd. Metodesammenlikningen viste godt samsvar mellom standardkurven i serum og standardkurven i fullblod. Resultatene fra holdbarhetsundersøkelsen viste at THC innfridde akseptkriteriene på  $CV \leq 15\%$  og relativt  $\text{avvik} \leq 20\%$ , etter tre tin og frys sykluser.

Standardkurven i serum kan erstatte standardkurven i fullblod ved bestemmelse av THC i fullblod med GC-MS. THC konsentrasjonen i fullblod ble ikke påvirket nevneverdig av gjentatte tin og frys sykluser, men prøvematerialet oppførte seg annerledes under prøveopparbeidelsen. Det anbefales at disse observasjonene undersøkes nærmere.

## Abstract

For this thesis an additional validation for quantitation of THC in blood was carried out. THC is an active component in cannabis and is quantitated in post-mortem blood by analysis with gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC-MS). The purpose of the thesis was to investigate whether it is possible to use calibration standards from serum for quantitation of THC in whole blood, as this will be less demanding than using blood. Additionally, a stability study was carried out to determine how the concentration of THC is affected by several freeze and thaw cycles.

The sample preparation used for the method was liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and derivatization, the principle of analysis was GC-MS. A simplified validation was carried out. This entailed examination of the lowest quantification limit, reproducibility, signal, and method comparison of the two types of calibration curves. The results for the calibration standards, quality controls and samples were evaluated according to the acceptance criteria from the department of Clinical Pharmacology (AKF).

The results fulfilled the criteria for lowest - limit of quantification, reproducibility, and accuracy with  $S/N \leq 30$ ,  $CV \leq 15\%$  and deviation  $\leq 20\%$ , respectively. The blood and serum calibration-curve comparison showed good compliance between the two calibration-standard curves from serum and blood. The THC results from the stability study met the criteria of  $CV \leq 15\%$  and deviation  $\leq 20\%$  three thaw and freeze cycles.

Calibration curves in whole blood can be replaced by serum when samples of THC in post-mortem blood are by GC-MS. The stability study showed that repeatedly thawing and freezing of the samples did not affect the concentration of THC. Observations during the sample preparation for the durability study showed that the frozen samples material behaved differently from the non-frozen samples. Further studies on this observation is recommended.

## Begreper og forkortelser

GC – Gasskromatografi

MF – Mobil fase

SF – Stasjonær fase

MS - Massespektrometri

THC – Tetrahydrocannabinol, aktivt virkestoff i cannabis

IS – Internstandard

LOQ – Laveste kvantifiseringsgrense

CV – Coefficient of variation – variasjonskoeffisient

SD – standard deviation – standardavvik

$\bar{X}$  – Middelvei for et tallsett

S/N – Signal/noise – forhold mellom målt signal og støy

RT – Retensjonstid

SPE – Solid phase extraction, fast-fase ekstraksjon

BSTFA - *N, O*-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide ( $C_8H_{18}F_3NOSi_2$ )

Post mortem – etter døden

Standardrekke – standarder og kontroller som benyttes ved analyse av THC i fullblod.

AKF – Avdeling for Klinisk Farmakologi



# Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>I</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>II</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>Begreper og forkortelser</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Innledning</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>Farmakokinetikken til THC</i> .....	1
1.2 <i>Ekstraksjon av THC</i> .....	3
1.3 <i>Derivatisering av THC</i> .....	5
1.4 <i>Separasjon av THC ved gasskromatografi</i> .....	5
1.5 <i>Deteksjon med massespektrometer</i> .....	6
1.6 <i>Tolkning av kromatogram</i> .....	8
1.7 <i>Internstandard, standarder og kontroller</i> .....	9
1.8 <i>Valideringsparametere</i> .....	11
1.9 <i>Problemstillinger</i> .....	16
<b>2 Materialer og metoder</b> .....	<b>17</b>
2.1 <i>Prøvemateriale</i> .....	17
2.2 <i>Kjemikalier</i> .....	19
2.3 <i>Ekstraksjon og derivatisering av THC fra fullblod</i> .....	20
2.4 <i>Fremgangsmåte for deteksjon av THC på GC-MS</i> .....	21
<b>3 Resultater og diskusjon</b> .....	<b>25</b>
3.1 <i>Sammenlikning av resultater for THC ved standardkurver i serum og fullblod</i> .....	25
3.1.1    Vurdering av analyserespons.....	25
3.1.1    Laveste kvantifiseringsgrense (LOQ).....	27
3.1.3    Reproduserbarhet og nøyaktighet.....	29
3.1.4    Kurvetilpasning.....	31
3.1.5    Sammenlikning av standardkurver for THC i serum og fullblod.....	33
3.1.6    Korrelasjon mellom standardkurver for THC i serum og fullblod.....	34
3.1.7    Bland-Altman plott.....	36
3.2 <i>Undersøkelse av konsentrasjonsendring etter tre tin/frys-sykluser</i> .....	37
<b>4 Konklusjon</b> .....	<b>39</b>
<b>5 Referanser</b> .....	<b>40</b>
<b>6 Vedlegg</b> .....	<b>42</b>

# 1 Innledning

Cannabisplanten er det mest utbredte ulovlige rusmiddelet i verden (1). Ifølge narkotikaforskriften §5 er cannabis narkotikalistet i Norge, noe som gjør det forbudt å blant annet besitte og bruke. I 2012 ble det fastsatt en promillegrense for cannabis på lik linje som for alkohol. Overskridelse av denne grensen er straffbart, i tillegg kan det påvirke forsikringsutbetaling ved eventuell ulykke (2). På bakgrunn av dette inngår måling av cannabis i blod i «standardpakken» av prøver som skal analyseres etter en trafikkulykke.

Ved avdeling for klinisk farmakologi (AKF) analyseres THC i matriksene urin, spytt, serum og fullblod. Rettsmedisinske analyser av cannabis i post-mortem blod er en av analysene som utføres. Det kan være vanskelig å vite hvordan stoffene fordeler seg i kroppen etter døden, som fører til stor usikkerhet rundt konsentrasjon av stoffet på dødstidspunktet. Post-mortem blod kan være svært viskøst, noe som gjør det vanskelig å skille serum fra blodcellene. Grunnet prøvematerialets beskaffenhet kan det til tider være umulig å pipettere, derfor blir post-mortem blod alltid veid ut.

For bestemmelse av cannabis i fullblod benyttes gaskromatografi med massespektrometri, GC-MS. I metoden måles delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), som er den mest psykoaktive komponenten i cannabis (3). Det benyttes standarder og kvalitetskontroller av fullblod. Holdbarheten til THC i fullblod er fire uker, når blodprøvene oppbevares i kjøleskap (4-8°C) (4). Laboratoriet antar at standarder og kontroller i fullblod ikke er holdbare ved oppbevaring i fryser (-20°C). I serum er holdbarheten av THC minst seks måneder ved oppbevaring i fryser (-20°C) (5).

For å redusere ressursbruken på laboratoriet der standardene fremstilles, skal det undersøkes om det er mulig å gå over fra bruk av standardrekker i blod til å bruke standardrekker i serum ved måling av cannabis i fullblod. I tillegg skal det undersøkes hvordan gjentatt tining og frysing av pasientprøver i fullblod vil påvirke THC-konsentrasjon. Dette gjøres på bakgrunn av at det er en forventning ved AKF om at THC-konsentrasjonen skal bli lavere etter frysing.

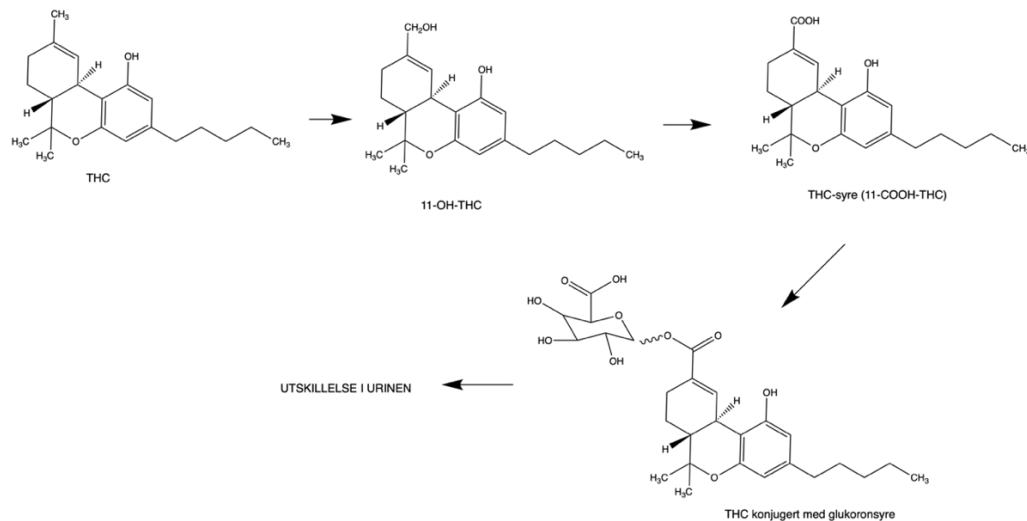
## 1.1 Farmakokinetikken til THC

Inntak av cannabis kan gjøres på flere måter. Røyking og peroralt er vanligst. Hvordan cannabis inntas vil påvirke absorpsjonen av virkestoffer inn i kroppen. Ved røyking vil THC absorberes

fra røyken og direkte over i blodet via gassutveksling i lungene. Cannabis kan påvises i blodet sekunder til minutter etter inhalering, og høyeste konsentrasjon kan ses etter minutter. Ved oralt inntak av cannabis, brytes THC ned og absorberes fra tarmen. Konsentrasjonen i blod er lavere ved oralt inntak enn ved inhalasjon, og høyeste konsentrasjon nås etter 1-6 timer. THC har høy fettløselighet og proteinbindingsgrad, som gir et høyt distribusjonsvolum over i vevet (6). Halveringstiden til THC er 24 timer.

Ved inntak av cannabis vil THC binde seg til cannabinoid-reseptorer, som finnes på cellemembranen til nerveceller og immunceller (7). Det er bindingen mellom THC og reseptorer i nerveceller som gir virkninger på kroppen, slik som endringer i humør, appetitt, bevissthet og hukommelse. Binding til immunceller vil påvirke immunsystemet (8).

Metabolisme av THC foregår hovedsakelig i leveren. THC oksideres og deretter konjugeres metabolitten med glukuronsyre. Dette gjør forbindelsen vannløselig, slik at den skilles ut i urin (figur 1.1). THC-syre (11-COOH-THC) konjugert med glukuronsyre er den dominerende metabolitten i urin (6).



Figur 1.1: Metabolismen og utskillelse av THC i kroppen.

Siden man kan finne THC og metabolitter fra THC i flere ulike kroppsvæsker, kan man benytte ulikt prøvemateriale avhengig av hva man er interessert i å finne ut. Det benyttes blodprøver til å bestemme om en person er ruspåvirket på det tidspunktet prøven tas. Urinprøver benyttes for å bestemme om rusmiddelet er blitt inntatt i løpet av den siste tiden. THC-metabolitter kan være

mulig å detektere i urin inntil tre måneder etter inntak avhengig av hvor hyppig cannabis har blitt brukt tidligere (6).

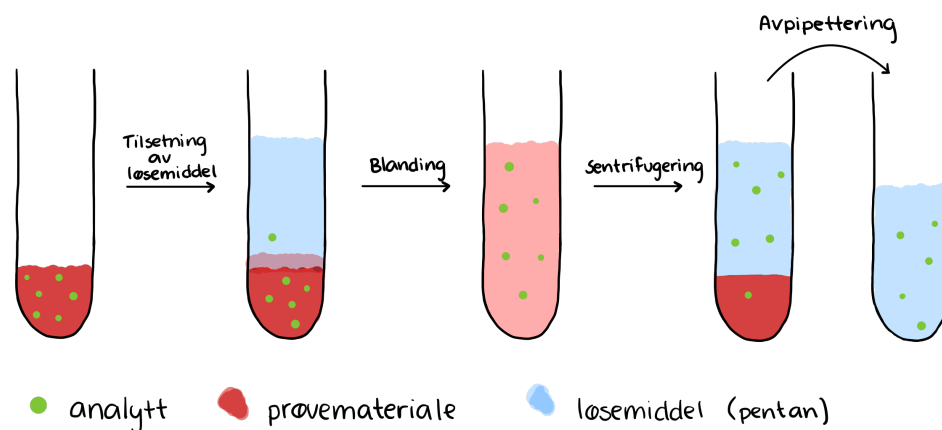
## 1.2 Ekstraksjon av THC

Før kvantitativ bestemmelse av THC, må post-mortem blod gjennom en dobbel ekstraksjon. Ved ekstraksjon blir prøven renset og THC oppkonsentrert. Dette er nødvendig for at prøven skal bli ren nok, slik at man unngår interferenser som kan påvirke kromatografien og deteksjon av THC (9).

### Væske-væske ekstraksjon

Væske-væske ekstraksjon er en metode som bruker to ulike væskefaser som ikke er blandbare med hverandre. Den ene væsken er en vandig løsning og den andre væsken er et organisk løsemiddel. Det organiske løsemiddelet er et godt løsemiddel for THC og et dårlig løsemiddel for forurensningene som salter og polare stoffer i post mortem blodet. I ekstraksjonen trekkes THC fra post-mortem blodet og over til organisk fase. Løsemiddelet sørger for at det skjer en proteinfelling som gjør det lett å skille uønsket materiale, som proteiner og celler, fra den organiske fasen, som inneholder THC. Det innstilles en likevektsfordeling av THC mellom de ikke-blandbare væskene.

THC er et upolart molekyl og har større affinitet til løsemiddelet (n-pentan) enn til blodet (vannfase). Molekylene vil derfor trekke over i det upolare løsemiddelet. Etter blanding, separeres væskefasene fra hverandre. Prosessen er vist i figur 1.2. Den ekstraherende væsken vil inneholde mye av analytten og mindre av de andre komponentene fra det opprinnelige prøvematerialet. Etter ekstraksjon vil man stå igjen med et renere produkt (10).

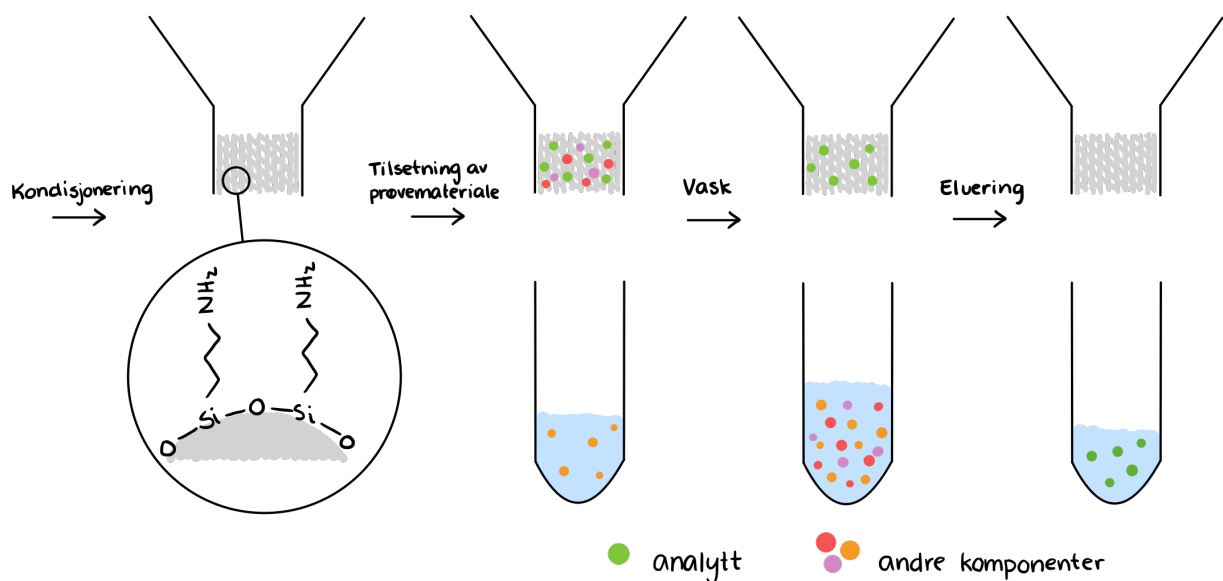


Figur 1.2: Illustrasjonen viser væske-væske ekstraksjon av THC i fullblod og hvordan analytten trekkes over i den organiske fasen gjennom blanding.

## Fast-fase ekstraksjon

Fast-fase ekstraksjon (SPE) vil i likhet med væske-væske ekstraksjon isolere, rense og oppkonsentrere THC. Prinsippet for ekstraksjonen er THC sin evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff, silica, og en væske. Det faste stoffet har funksjonelle grupper,  $\text{NH}_2$ , på overflaten som interagerer med THC. THC vil feste seg til det faste stoffet da interaksjonen mellom THC og  $\text{NH}_2$  er sterkere enn interaksjonene mellom THC og væsken. Selve ekstraksjonen gjøres i fire trinn. Kondisjonering, tilsetning av prøve, vasking og eluering (11).

Kolonnene kondisjoneres før prøvematerialet tilsettes. Dette er for å fjerne eventuelle urenheter i kolonnen og aktivere de funksjonelle gruppene i kolonnematerialet. Ved å aktivere de funksjonelle gruppene, sikrer man god kontakt mellom prøveløsningen og gruppene i kolonnematerialet (11). For å kondisjonere kolonnen, skylles det upolare løsemiddelet, n-pentan, gjennom kolonnen. Etter kondisjonering tilsettes prøven i kolonnen. Kolonnematerialet vaskes med en løsning av pentan og 4% etylacetat etter alt prøvemateriale har rent gjennom kolonnen. Dette er for å fjerne andre stoffer i prøven som ikke er bundet til den faste fasen. Siste trinn i ekstraksjonen er eluering. Det tilsettes en løsning av pentan og 7% etylacetat, som vil få molekylene til å løsne fra kolonnematerialet. Analytten må ha en sterkere affinitet til elueringsløsningen enn til kolonnematerialet for at den skal løsne (12). Alle løsninger renner gjennom kolonnen uten at det påvirkes av annet enn tyngdekraften. Hele prosessen er illustrert i figur 1.3.



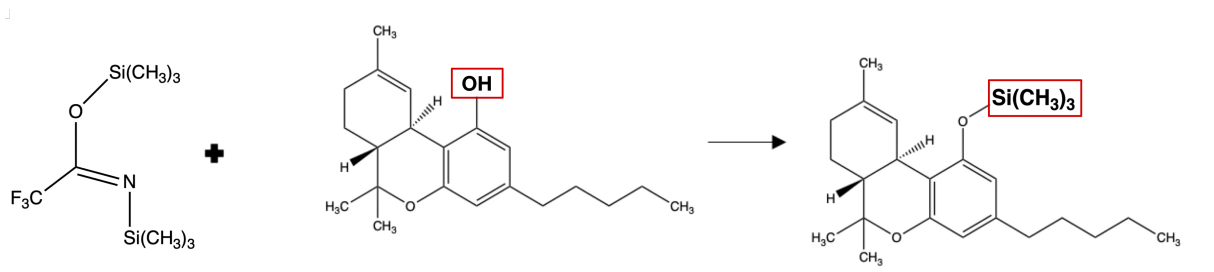
Figur 1.3: Illustrasjon av fast-fase ekstraksjon av THC i fullblod, hvor analytten separeres fra andre komponenter i prøvematerialet.

### 1.3 Derivatisering av THC

Derivatisering er en metode som benyttes til å endre analyttens egenskaper for å sikre tilstrekkelig separasjon og et godt analyseresultat. Gjennom derivatiseringsprosessen kan man lage flyktige, termisk stabile derivater som kan analyseres.

Flyktigheten vil påvirke hvor raskt molekylene går over i gassform ved injeksjon, og vandringshastigheten gjennom kolonnen. Aktive hydrogenatomer har evnen til å danne hydrogenbindinger som gjør molekylene polare og gir høyere kokepunkt. Ved å senke kokepunktet, vil molekylens flyktighet øke. Dette kan gjøres ved å bytte ut et aktivt hydrogenatom i en funksjonell gruppe på molekylet. Da vil molekylets evne til å danne hydrogenbindinger reduseres, og molekylet blir mer flyktig. På den måten vil analytten bevege seg raskere gjennom kolonnen, og separasjonen vil forbedres (14).

BSTFA benyttes til derivatisering av THC i fullblod før analyse på GC-MS. Ved bruk av BSTFA vil den funksjonelle gruppen i THC, en hydroksylgruppe (-OH), byttes ut med den upolare trimetylsilyl-gruppen (-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) (13) (Figur 1.4). Produktet fra reaksjonen er THC-TMS (delta-9-tetrahydrocannabinol-trimetylsilyl), som har et lavere kokepunkt.



Figur 1.4: Derivatiseringsreaksjonen som skjer under prøveoppbeidelsen av THC i fullblod.

### 1.4 Separasjon av THC ved gasskromatografi

Kromatografi er en separasjonsmetode som separerer molekyler ved bruk av to ulike faser, stasjonærfase (SF) og mobilfase (MF).

Gasskromatografi (GC) er en kromatografisk metode som benytter en gass som MF. Metoden skiller flyktige komponenter i prøven, både naturlig flyktige og komponenter som er gjort flyktige ved derivatisering. Hensikten med MF er å bære molekylene gjennom kolonnen. Gassen som brukes er inert, som vil si at den ikke vil reagere med stoffer i prøven. Hvilken gass

man velger å bruke på instrumentet, avhenger gassens fysiske og kjemiske egenskaper, og renhet. For analyse av THC i fullblod, benyttes det helium som MF.

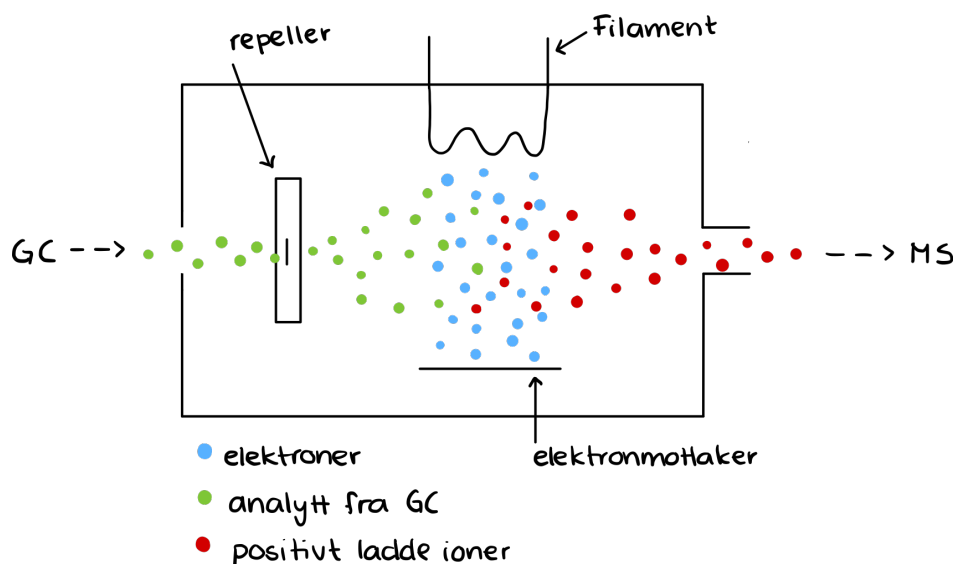
SF dekker innsiden av kolonnen. Molekylenes vandringshastighet gjennom kolonnen avhenger av molekylets flyktighet og affinitet til SF. Molekyler som har høy affinitet til SF, vil interagere mer med denne under vandringen og dermed holdes mer igjen. Dette vil gi molekyler med lav affinitet til SF en kort retensjonstid og molekyler med høy affinitet til SF en lenger retensjonstid. På denne måten oppnår man en god separasjon av molekyler basert på deres egenskaper (8).

## 1.5 Deteksjon med massespektrometer

Massespektrometer (MS) er et instrument som differensierer molekyler på masse og ladning. Dette gjøres ved at molekylene ioniseres før de separeres i et elektromagnetisk felt, som er satt til en spesifikk masse/ladning-ratio ( $m/z$ -ratio) (8). Alle MS består av de samme komponentene: en ionekilde, masseanalysator og detektor. Alle disse komponentene er i et vakuum-system. Dette er til for å hindre at molekylene som skal detekteres, kolliderer med andre molekyler underveis i analysen (8). Fordelen ved å benytte MS som detektor er at den vil gi informasjon om analyttens struktur i tillegg til kvantifisering.

### **Ionekilde**

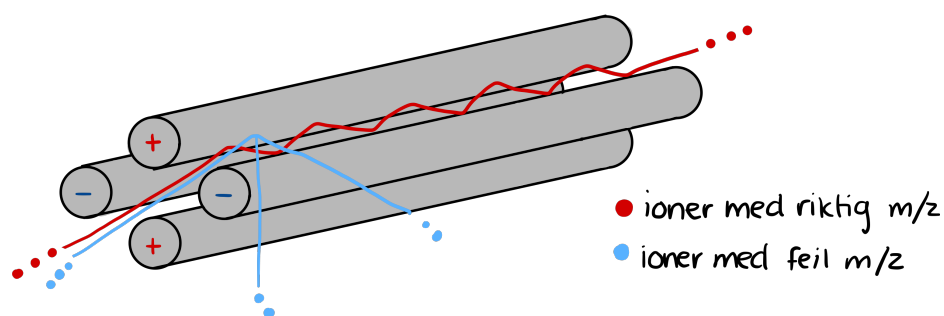
For å gjennomføre massespektrometri er det nødvendig å ha molekylet på ioneform. Det første trinnet vil derfor være ionisering. Det finnes ulike måter å ionisere molekylene på. En vanlig ioniseringsmetode som benyttes i kombinasjon med GC, er elektronionisering (EI). Molekyler i gass-fase blir bestrålt med elektroner fra et oppvarmet filament. Elektronene har nok kinetisk energi til å slå ut et elektron fra molekylet som blir bestrålt, og det vil dannes kationer (8) (figur 1.5). Molekylet vil splittes inn i kjente ioner. Hvordan det splittes vil være likt hver gang. Ved resultatbehandling, vil man se på kvantifiseringsion og kvalifiseringsion, som er to fragmenter fra samme molekyl. Det fragmentet som dannes i størst mengde kalles et kvantifiseringsion, og er det som brukes til kvantifisering. Et kvalifiseringsion er et kjent fragment man vet vil være til stede dersom analytten er i prøven. Kationene som dannes vil, ved hjelp av et elektrisk felt, fraktes videre inn i masseanalysatoren.



Figur 1.5: Illustrasjon av ionekilden som viser hvordan molekyler fra kromatografen omdannes til kationer ved hjelp av elektronstrålen.

### Masseanalysator

Den mest brukte typen masseanalysator er kvadrupol-MS. En kvadrupol består av fire parallelle elektromagnetiske staver, to positivt ladet og to negativt ladet. Stavene er arrangert på en slik måte at det dannes et hulrom i midten, der ionestrømmen vil gå (figur 1.6) (8). De motstående elektrodene er koblet sammen og danner et elektrisk felt mellom seg. Et elektrodepar er koblet til radiofrekvenskilde ( $V_0$ ) og det andre til en likestrøm-kilde ( $U$ ). Ved å variere forholdet mellom  $V_0$  og  $U$ , vil man kunne filtrere ut ioner med bestemt  $m/z$ -ratio (15). Ioner med feil  $m/z$ -ratio vil støtes vekk.

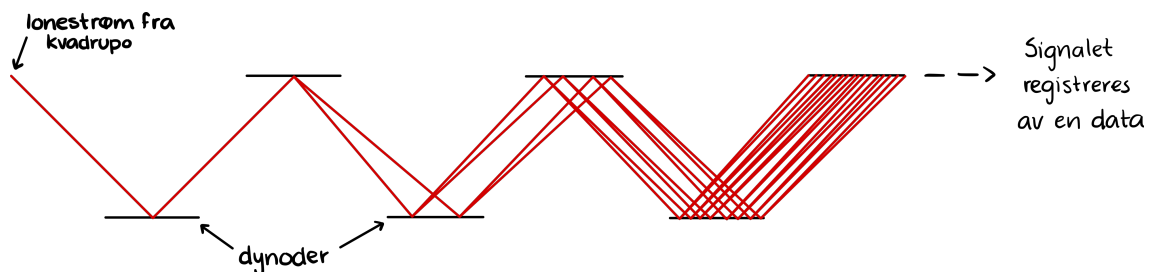


Figur 1.6: I figuren vises kvadrupolen med fire parallelle elektromagnetiske staver. I midten er et hulrom, hvor ioner med riktig masse/ladning ( $m/z$ )-ratio (rødt) vil bevege seg.



## Detektor

Elektronmultiplikatoren er den vanligste detektoren i forbindelse med GC-MS. Elektronmultiplikatoren benytter amplifisering av signal gjennom sekundær emisjon (16). Når ionestrømmen fra masseanalysatoren sendes mot elektronmultiplikatoren, vil den sendes gjennom en sammenkoblet kjede av dynoder. Dynodene er gode sekundære emittere og når et ion treffer dynoden, vil det enkelte signalet fordobles. Energien som ionet har når den treffer dynoden vil omdannes slik at elektroner emitteres. Denne multiplikasjonsprosessen gjentas gjennom hele dynode-kjeden. Fra det enkelte ione-signalet vil man oppnå et forsterket signal, ofte forsterket med  $10^4$ - $10^8$ . Hvordan signalet fordobles gjennom elektronmultiplikatoren kan man se i figur 1.7 På enden av dynodekjeden er det en detektor som teller antall elektroner som treffer per tidsenhet. Resultatet presenteres i et massespektrum (8).

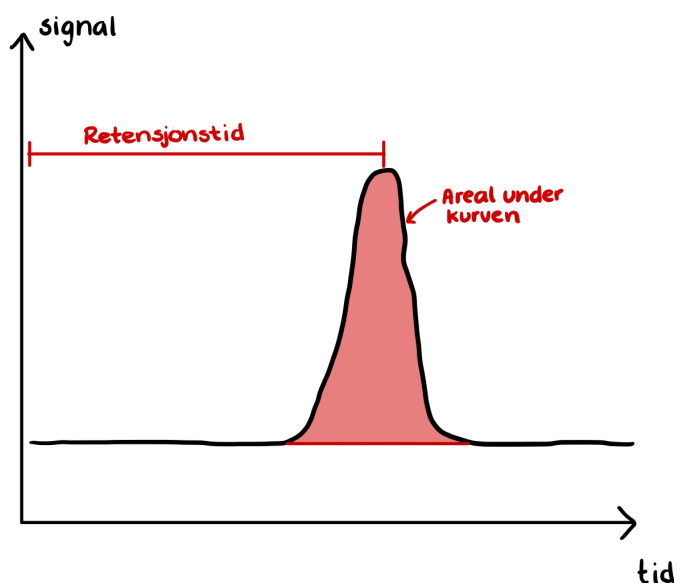


Figur 1.7: Figuren viser hvordan ionestrømmen fra kvadrupolen beveger seg og fordobles mellom dynoder i elektronmultiplikatoren.

## 1.6 Tolkning av kromatogram

Ved tolkning av kromatogram ser man på retensjonstiden til stoffet, utseendet til kurven, hvordan kurven er integrert, og forholdet mellom kvantifiseringsion og kvalifiseringsion.

Retensjonstiden (RT) er den gjennomsnittlige tiden det tar for et bestemt molekyl å vandre gjennom kolonnen. Dette er illustrert i figur 1.8. Ulike molekyler vil ha forskjellige retensjonstider. RT påvirkes hovedsakelig av interaksjonen mellom molekylene og SF. Molekyler som har høyere affinitet til SF enn MF vil få lenger RT enn molekyler med høyest affinitet til MF (8). RT til en analytt vil endres etter kolonnen. Når kolonnen blir slitt, vil mindre analytt holdes igjen av SF og RT blir kortere. Når det blir tatt i bruk en ny kolonne vil RT bli lenger fordi helt ny SF vil holde igjen mer analytt.



Figur 1.8: Illustrasjon av et kromatogram, hvor det måles retensjonstid og areal under kurven. I figuren kan man også se hvordan en kurve skal integreres (rødt), for at man skal kunne bruke arealet under kurven til å beregne konsentrasjonen til analytten i prøven.

Ved vurdering av et kromatogram, vil man også se om kurven er symmetrisk eller om det er asymmetri til stede. Ved kromatografi vil man ha kurver som er symmetriske. Asymmetri kan ses som tailing eller fronting. Tailing skyldes dannelse av hydrogenbindinger mellom SF og analytt, som fører til at noe av prøvematerialet henger igjen i SF. Fronting skyldes at det er påsatt for mye prøvemateriale, slik at noen av molekylene kommer for tidlig.

For å kunne benytte arealet under kurven til kvantifisering av THC i prøvene, må kurvene først integreres. Det er viktig at alle kurvene integreres likt, slik at kvantifiseringen blir riktig, og at prøvene kan sammenlignes. Figur 1.8 viser en integrert kurve.

Ved resultatbehandling, ser man både på kvantifiseringsionet og kvalifiseringsionet. Ionene kommer fra det samme molekylet og vil ha lik retensjonstid. Forholdet mellom ionene skal være konstant i hele analyserekken. Dersom dette avviker, tyder det på feil i analysen eller at signalet kommer fra et annet molekyl.

## 1.7 Internstandard, standarder og kontroller

### Standarder

For å kunne beregne resultater fra en kromatografisk analyse, er det nødvendig å ha en kurve å beregne resultatene ut ifra. Denne kurven dannes ved å analysere en rekke prøver med kjent

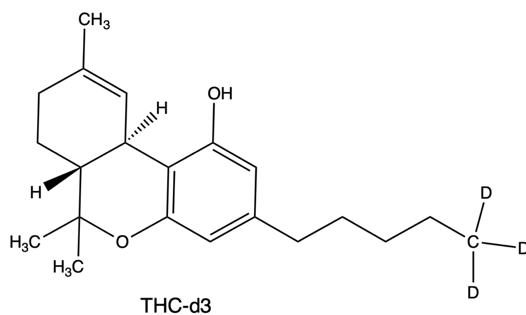
konsentrasjon av analytten i ulike nivåer, kalt standarder. Når man velger nivåer for standardene, er det viktig å tenke på at standardene skal dekke hele måleområdet til analytten. Resultatene bearbeides for å finne en formel for konsentrasjon som funksjon av målt signal.

### Kontroller

For å kontrollere at standardkurven gir riktige resultater, benyttes det kontroller. Dette er prøver med kjent verdi av THC. Prøvene opparbeides og behandles helt likt som pasientprøver gjennom hele analyseforløpet. Etter analysering sammenlignes kontrollenes resultat med den teoretiske verdien. Kontrollresultatet må være innenfor bestemte avviksgrenser for at analyserekken skal kunne godkjennes. Dersom kontrollresultatene havner utenfor grensene, må hele analyserekken forkastes. Dette er fordi man da ikke kan vite om prøveresultatene blir riktige. Det er vanlig å benytte flere kontroller, i ulike nivåer, for å vurdere riktigheten i hele måleområdet.

### Internstandard

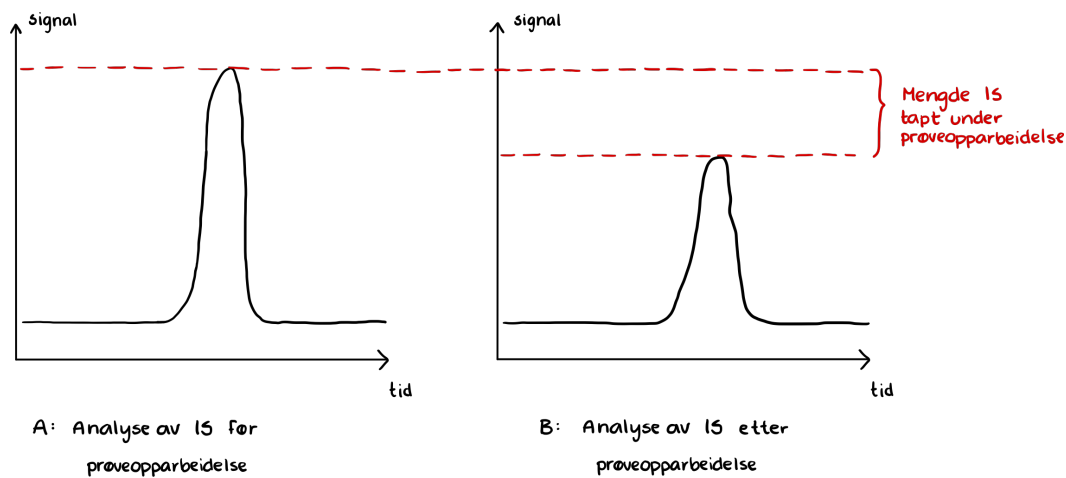
Internstandard (IS) er et stoff med kjent konsentrasjon som tilsettes i kjent mengde i alle prøver i en analyserekke, altså i standarder, kontroller og prøver. Stoffet som brukes, bør være så likt analytten som mulig uten at det interferer med analysen. Ofte benyttes isotoper av analytten som IS (12). Ved analyse av THC i fullblod benyttes deuterium-merket THC som IS (figur 1.9).



Figur 1.9: Deuterium-merket THC.

IS tilsettes som første steg i prøveoppbeidelsen, og vil gjennomgå alle trinnene i analyseforløpet på lik linje med analytten. Hensikten med IS er at man skal kunne kompensere for eventuelt tap av analytt under prøveoppbeidelse og analyse (17). Dette er illustrert i figur 1.10. Optimalt vil IS oppføre seg på samme måte som analytten under prøveoppbeidelsen,

både i ekstraksjon og derivatisering. Siden IS og analytt behandles på samme måte og er svært like stoffer, vil mengden tap av IS være et godt bilde på hvor mye analytt som har gått tapt.



Figur 1.10: Figuren viser forskjellen i mengden internstandard (IS) før og etter prøveoppbeidelse. I kromatogram A er mengden IS målt før prøveoppbeidelse. I kromatogram B er mengden IS målt etter prøveoppbeidelse. Avstanden mellom de to røde linjene viser mengden av IS tapt under prøveoppbeidelsen.

## 1.8 Valideringsparametere

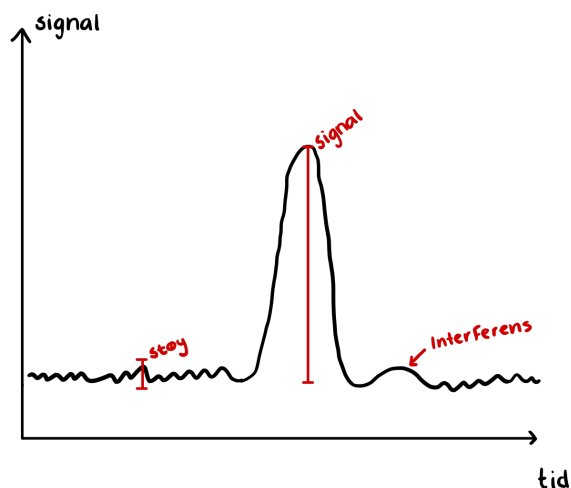
Før en metode kan bli tatt i bruk i medisinske laboratorier må den valideres. Dersom man vil gjøre endringer på en metode som allerede er validert kan man gjennomføre en tilleggsvalidering, eller en forenklet validering. Da vil man ikke se på alle valideringsparametere, men kun de som kan påvirkes av endringene som skal gjennomføres. I denne oppgaven gjennomføres det en tilleggsvalidering på metoden for THC i fullblod, for å se om det kan byttes matriks på standardrekken.

### Laveste kvantifiseringsgrense

Laveste kvantifiseringsgrense (LOQ) er laveste konsentrasjonen eller masse av en analytt som må være til stede i en prøve for at den skal bli kvantitert med en viss sikkerhet. Den kvantitative undersøkelsen må ha en god nok presisjon og nøyaktighet for det som er satt for metoden. LOQ kan undersøkes ved å studere S/N-ratioen, signal til støy ratio. (18) Ved å vurdere ratioen vil man kunne identifisere hvor stor innvirkning bakgrunns-signalet har på kvantifiserings-signalet og på denne måten bestemme LOQ. Standard 1 er standarden med lavest konsentrasjon, og er

derfor godt egnet til vurdering av LOQ. I laboratoriet er LOQ er satt til å være konsentrasjonen til den laveste standarden, standard 1.

S/N-ratioen er forholdet mellom signalet til analytten og bakgrunnsstøy. Bakgrunnsstøy vil være små signaler som kommer jevnt hele tiden. For at man med en viss sikkerhet skal kunne si at signalet man får ikke er støy, er det satt en minimumsgrense for S/N-ratioen. Figur 1.11 viser forskjellen mellom signal og bakgrunnsstøy i et kromatogram. Her er også interferens vist. Interferens kommer av andre molekyler i prøven som vil gi signal i samme område som analytten. Dette kan gjøre det vanskeligere å integrere kurvene, slik at arealet blir korrekt. Når man velger området som skal være grunnlaget for bakgrunnsstøy er det viktig å bruke et område som er i nærheten av kurven, men som ikke inneholder mulige interferenter. Dette kan gi en ratio som er falskt for lav. Ratioen er best å undersøke ved lave konsentrasjoner av analytten. Dette er fordi ved lave konsentrasjoner av analytten vil, bakgrunnsstøy ha større innvirkning på beregning av resultat.



Figur 1.11: Illustrasjon av signal og støy i et kromatogram. Støy er små signaler man vil se langs hele kromatogrammet i konstante, små bølger. Signaler er tydelige topper som er signifikant forskjellig fra støy. Man kan også se interferens i kromatogrammer, som ses som noe større topper i nærheten av signalet til analytten.

Fastsatte krav for vurdering av laveste kvantifiseringsgrense (19):

I Standard 1 (LOQ) skal S/N-ratio  $\geq 30$  for kvantifiseringsionet og S/N-ratio  $\geq 10$  for kvalifiseringsionet.

Interferens fra standard 0 bør være  $\leq 20\%$  av standard 1.

## Reproduserbarhet og nøyaktighet

Presisjon sier noe om hvor nære resultatet til uavhengige målinger av samme prøve er hverandre. For å undersøke presisjon, kan man blant annet se på reproduserbarheten. Reproduserbarheten er hvor nære uavhengige målinger av samme prøve, under ulike forutsetninger, er hverandre (8). Reproduserbarheten er gitt ved middelvei og CV (%) for hvert konsentrasjonsnivå.

For å beregne CV (%) benyttes standardavviket (SD) og middelveien ( $\bar{X}$ ) til resultatene man vil undersøke. Dette er vist i formel 1. CV (%) sier noe om variasjonen mellom tre eller flere verdier i et datasett. SD sier noe om verdienes avstand fra gjennomsnittsverdien (20).

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

Fastsatte krav for vurdering av presisjon:

Reproduserbarheten, gitt ved CV (%), skal være  $\leq 15\%$  for kontrollene over minimum fire dager.

Nøyaktighet gir et tall på hvor nært en metodes resultat er den teoretiske verdien av analytt i en prøve (8). Nøyaktighet undersøkes ved å vurdere avviket (%) mellom den målte verdien og kjent teoretisk verdi på prøvene (formel 2).

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

Fastsatte krav for vurdering av nøyaktighet:

For standarder og kontroller, skal avviket fra teoretisk verdi være  $\leq 20\%$  ved bruk av standarder i serum.

For tillagde prøver skal avviket fra teoretisk verdi være  $\leq 15\%$ . Teoretisk verdi er resultater beregnet med fullblod standarder og målt verdi er resultat beregnet med serum standarder.

## Kurvetilpasning

Målte verdier for THC i standarder brukes til å lage en standardkurve. Likningen settes opp etter formel 3. I denne formelen er a stigningen til regresjonslinjen og b er skjæringspunktet mellom linjen og y-aksen.

$$y = ax + b \quad (3)$$

Likningen til standardkurven benyttes til å beregne konsentrasjonen av THC i kontroller og pasientprøver. Ved kurvetilpasning vurderes det om kurven er lineær eller ikke-lineær, og linearitetsområdet undersøkes. Resultatet av undersøkelsene gis som en vurdering av kurvene som dannes, samt avvik (%) fra teoretisk verdi.

Fastsatte krav for vurdering av kurvetilpasning:

Avvik (%) mellom resultater beregnet med standardkurve i serum og standardkurve i fullblod skal være  $\leq 20\%$ .

### **Sammenlikning av standardkurver**

Standardkurvene som dannes ved bruk av standarder i forskjellig matriks kan sammenliknes for å se om det er store forskjeller på likningene. Kurvene vurderes visuelt, og likningen for standardkurvene undersøkes. Dersom det ikke er store ulikheter, vil man kunne benytte en annen matriks som standarder.

### **Korrelasjon mellom standardkurver**

Et korrelasjonsdiagram viser sammenhengen mellom to datasett. Hensikten med å lage et korrelasjonsdiagram er at det viser hvor like resultater de to kurvene gir. I diagrammet vil resultater oppnådd med blodkurve settes opp mot resultater oppnådd med serumkurve. Basert på dette, kan man lage en regresjonslinje. Likningen for regresjonslinjen er gitt ved den generelle formelen, formel 3. Stigningstallet viser om det er en proporsjonal forskjell mellom standardkurvene, mens skjæringspunktet viser om det er en konstant forskjell mellom standardkurvene. Dersom de to datasettene som sammenliknes er helt like, vil linjen ha et stigningstall på 1 og et skjæringspunkt på 0. Linjen vil da ha formelen  $y = x$ .

I et korrelasjonsdiagram, vurderes også korrelasjonskoeffisienten ( $r$ ) til regresjonslinjen.  $r$  vil være et tall mellom -1 og 1, som uttrykker kurvenes lineære sammenheng. 1 betyr at standardkurvene er identiske, mens 0 betyr at det ikke finnes noen lineær sammenheng (20).

Det kan gjennomføres en regresjonsanalyse, for å vurdere 95% konfidensintervall (KI) for regresjonslinjen. KI er et område man med en bestemt sikkerhet kan si at en verdi befinner seg innenfor (20). Ved vurdering av KI, ser man om stigningstall på 1 og skjæringspunkt på 0 ligger innenfor dette området.

### **Bland-Altman plott**

Bland-Altman plott er et differanseplott som brukes til visuell fremstilling av forskjellen mellom to datasett der det forventes parvis lik verdi. Plottet viser THC konsentrasjon beregnet med fullblod standardkurve som referanseverdi (x-aksen), mot differansen mellom resultatene beregnet med ulik standardkurve i serum og fullblod (y-aksen). Noe som skiller Bland-Altman fra andre differanseplott er muligheten til å legge inn grenseverdier, konfidensintervall. Grenseverdiene er beregnet ut fra valgt konfidensnivå. Det tegnes en linje for gjennomsnittlig avvik mellom prøvene. Når plottet vurderes er det interessant å se hvordan denne gjennomsnittslinjen ligger i forhold til «null-linjen», som er gitt ved  $y=0$  (ingen avvik mellom prøvene). Dette vil gi en god indikasjon på standardkurvenes likhet (21).

### **Holdbarhetsundersøkelse av frosne prøver**

Holdbarhetsundersøkelser gjøres for å se hvordan ulik oppbevaring påvirker prøvemateriale. I dette tilfellet går undersøkelsen ut på å se om gjentatte omganger med frys og tin av prøver påvirker konsentrasjonen av THC. Resultatet av undersøkelsene gis som middelverdi, CV (%), nøyaktighet (% avvik) og relativt avvik på hvert nivå.

Relativt avvik er avviket mellom de målte verdiene og en referanseverdi. Her er de målte verdiene resultatet på kontrollene som har vært tint og fryst, mens referanseverdien er resultatet for kontroller som ikke har vært fryst. Beregning av relativt avvik er vist i formel 4.

$$\text{Relativt avvik (\%)} = \frac{\text{målte verdier} - \text{referanseverdi}}{\text{referanseverdi}} \cdot 100\% \quad (4)$$

Anbefalte akseptkriterium for holdbarhetsundersøkelse:

Avviket, gitt ved CV (%) skal være  $\leq 15\%$ .

For kontroller skal relativt avvik være  $\leq 20\%$ .



## 1.9 Problemstillinger

Målet med oppgaven er å gjennomføre en tilleggsvalidering av analyse av THC i fullblod på GC-MS. Problemstillingene omfatter sammenlikning av standardkurver i serum og fullblod ved analyse av THC og undersøkelse av holdbarhet av THC i fullblod.

### **Undersøkelse om serum-standardkurve kan benyttes til fullblodsprøver**

Hvordan vil en overgang fra standardkurve i fullblod til standardkurve i serum påvirke signalstyrken?

Vil S/N-ratio i standard 1 og interferens i standard 0 oppfylle kravene slik at nedre kvantifiseringsgrense for THC fra fullblod kan brukes i serum?

Hvordan er reproduserbarheten ved bruk av standardkurve i serum sammenliknet med standardkurve i fullblod?

Er avviket mellom teoretisk verdi og beregnet resultat med standardkurve i serum innenfor akseptkriterium på avvik  $\leq 20\%$ ?

Er det samsvar mellom standardkurvene i konsentrasjonsintervallet 1,00-25,0  $\mu\text{g/L}$ ?

### **Undersøkelse av holdbarhet av THC i fullblodprøver etter frysing**

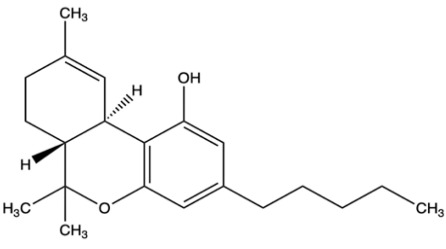
I hvor stor grad påvirker tre runder i fryseren konsentrasjonen av THC i fullblod, og vil CV og relativt avvik være innenfor kravene på henholdsvis  $\leq 15\%$  og  $\leq 20\%$ ?

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Prøvemateriale

Det ble benyttet nullblod tilsatt THC som prøvemateriale. De kjemiske egenskapene til THC er beskrevet i tabell 2.1. Nullblod og -serum er blod og serum som ikke inneholder THC. Ved tillaging av standarder og kontroller, ble det tilsatt en kjent mengde THC. Teoretisk verdi for standarder og kontroller er satt inn i tabell 2.2.

Tabell 2.1: Oversikt over kjemiske egenskaper til analytten (THC)

Kjemiske egenskaper	THC
Molekylstruktur	
Strukturformel	$C_{21}H_{30}O_2$
Molar masse	314,46 g/mol
Kokepunkt	157 °C
Cas-nr.	1972-08-3
Halveringstid ( $T_{1/2}$ )	24 timer
Molar masse derivatisert THC (THC-BSTFA)	386 g/mol
Kvantifiseringsion (m/z)	371 (THC-BSTFA)
Kvalifiseringsion (m/z)	386 (THC-BSTFA)

Tabell 2.2: Oversikt over nivå og teoretisk verdi til standarder og kontroller som ble brukt under oppgaven.

Prøve	Nivå	Fullblod (ng/mL)	Serum (ng/mL)
Standard 0 (Std 0)	0	0,0	0,0
Standard 1 (Std 1)	1	1,0	1,0
Standard 2 (Std 2)	2	2,5	2,5
Standard 3 (Std 3)	3	12,5	12,5
Standard 4 (Std 4)	4	25,0	25,0
Kontroll 1 (QC 1)	5	1,5	1,5
Kontroll 2 (QC 2)	6	5,0	5,0
Kontroll 3 (QC 3)	7	20,0	20,0

Prøvemateriale som ble brukt var 32 prøver som var tillaget fra nullblod til forskjellige verdier innenfor måleområdet for THC i fullblod [1,0 – 25,0] ng/mL. Den teoretiske verdien til disse prøvene var ikke kjent.

## 2.2 Kjemikalier

Kjemikalierne som ble benyttet under opparbeidelse og analyse er satt inn i tabell 2.3.

Tabell 2.3: Oversikt over kjemikalier benyttet under prøveoppbeidelse og analyse på GC-MS.

Produkter/kjemikalier	Produsent	Lot-nr./batch	CAS-nr.	Kvalitet
$\Delta^9$ -THC-d3 (IS)	Cerilliant	01/18	-	-
$\Delta^9$ -THC (til standardrekker)	Cerilliant	01/22	-	-
$\Delta^9$ -THC (til QC)	LGC	01/22	-	-
n-Pentan	Supelco®	K55351277 237	109-66-0	≥ 99,0 %
Etylacetat HiPerSolv CHROMANORM®	VWR	22H302845	141-78-6	≥ 99,8 %
Acetonitril hyperren for LC-MS LiChrosolv®	Supelco®	I1222829 227	75-05-8	≥ 99,97 %
BSTFA	Apollo Scientific	AS500467	25561-30-2	99+ %
Butylacetat AnalaR NORMAPUR®	VWR	20D174001	123-86-4	≥ 99,0 %
Helium	AGA/Linde Group	-	7440-59-7	≥ 99,99 %
Nitrogen (N <sub>2</sub> )	AGA/Linde Group	-	-	-

Løsningene som ble benyttet i fast-fase ekstraksjonen og derivatisering måtte lages samme dag.

Tabell 2.4 gir oversikt over volum, konsentrasjon og kjemikalier som ble benyttet.

Tabell 2.4: Oversikt over volum og kjemikalier som ble benyttet under tillaging av reagenser til fast-fase ekstraksjon og derivatisering.

Tillaging av reagenser til prøveopparbeidelse			
Volum	Konsentrasjon	n-pentan	Etylacetat
100mL	n-pentan m/ 4% etylacetat	96 mL	4 mL
100mL	n-pentan m/ 7% etylacetat	93 mL	7 mL
Volum	Konsentrasjonsstyrke	BSTFA	Acetonitril (ACN)
1200µL	BSTFA/ACN (1+2)	400µL	800µL

### 2.3 Ekstraksjon og derivatisering av THC fra fullblod

Det ble gjennomført to ekstraksjoner, væske-væske- og fast-fase ekstraksjon. Prøvene ble deretter derivatisert og analysert med GC-MS. Utstyr som ble benyttet under prøveopparbeidelsen er satt i tabell 2.5. Reagenser til vask, eluering og derivatisering ble laget samme dag som prøven ble opparbeidet (tabell 2.4). Flytskjemaet som ble benyttet under prøveopparbeidelsen er lagt ved i vedlegg 1.

Tabell 2.5: Utstyr, produkt og produsent for materialer benyttet under prøveopparbeidelsen

Utstyr	Produkt	Produsent
Sentrifuge	Mega Star 1.6 (3-II) <i>RCF: 4100, Radius: 166 mm</i>	VWR
Kolonnestativ til 24 kolonner	Supelco® Visiprep SPE Vacuum Manifold	Sigma-Aldrich Co.
Kolonner	Bond Elut NH <sub>2</sub> , 100 mg pakkemateriale	Agilent Technologies

#### Væske-væske ekstraksjon

Standarder, kontroller og prøvemateriale (1,0 mL, tabell 2.2) ble tilsatt internstandard,  $\Delta^9$ -THC-d<sub>3</sub> (50µl) og blandet med håndmikser (10 sek). Etter blanding, ble pentan (6 mL) tilsatt og glassene ble korket. THC ble ekstrahert over i pentan ved at stativet med prøveglassene ble satt på en vippe (10 min) og deretter sentrifugert (4700 RPM, 10 minutter). Pentansjiktet (det øverste sjiktet) ble pipettert over i kolonner for videre prøveopparbeidelse med fast-fase ekstraksjon.

### **Fast faste ekstraksjon**

Rundbunnede reagensglass ble satt i alle 24 posisjonene i kolonnestativet. Før selve ekstraksjonen kunne begynne, ble kolonnene kondisjonert. Dette ble gjort ved å tilsette pentan (2 mL) i hver av kolonnene. Når væsken hadde rent gjennom, ble prøvematerialet fra de sentrifugerte reagensglassene overført til kolonnene (øverste sjiktet). Når alt prøvemateriale hadde rent gjennom, ble pentan (2 mL) tilsatt for å vaske materialet i kolonnen. Etter første vask hadde rent gjennom, ble en løsning av pentan med 4% etylacetat (4 mL, tabell 2.4) tilsatt for å vaske ytterligere. Når alt av væske hadde rent gjennom, ble de rundbunnede glassene byttet ut med spissbunnede glass. En løsning av pentan med 7% etylacetat (4 mL, tabell 2.4) til eluering av analytt ble tilsatt. Etter eluering, ble væsken dampet inn ved bruk av N<sub>2</sub>-gass til det ikke var væske igjen i glassene.

### **Derivatisering**

Derivatiseringen ble gjennomført etter fast-fase ekstraksjonen. En løsning med BSTFA m/ Acetonitril (35µl, tabell 2.4), ble tilsatt i hvert glass. Spissglassene ble korket og satt i en varmeblokk (70°C, 15 min) for derivatisering. Glassene ble avkjølt til romtemperatur med korkene på. Etter avkjøling, ble væsken dampet inn ved bruk av N<sub>2</sub>-gass til all væske var fordampet. Det inndampede materialet ble reløst i butylacetat (30µl) og korket (20 min ± 5 min). All væsken i glassene ble overført til vials med inserts og klart for analysering.

## **2.4 Fremgangsmåte for deteksjon av THC på GC-MS**

Etter prøveopparbeidelse og derivatisering, ble vials satt i brett på instrumentet. For hver analyserekke ble det laget en sekvens, der prøverekkefølgen ble lagt inn i instrumentet. Informasjon om utstyr som ble benyttet under analyseringen er satt i tabell 2.6 og innstillingene som ble benyttet på instrumentet er satt i tabell 2.7. Etter analysering av THC i fullblod på GC-MS, ble kromatogrammene vurdert i Chromeleon.

Tabell 2.6: Utstyr til GC-MS instrument som ble benyttet i denne oppgaven.

Type utstyr	Produkt	Spesifikasjoner	Produsent
Autosampler	Triplus RSH Mod: 1R77010-0X00	-	Thermo Fischer Scientific
Syringe	THS 365D0331	Volum: 10 µl	Thermo Fischer Scientific
Ferrule	Produktnummer kan være	-	Agilent/Restek/Thermo
Septum	5183-4759	-	Agilent
Liner	Topaz Liner RES 23300	Split, splitless straight w/wool 4mm x 6,3 x 78,5	Restek
Autosampler (syringe)	THS 365D0331	Volum: 10 µl	Thermo Fischer Scientific
GC-instrument	Trace 1310 GC	-	Thermo Scientific
Kapillærkolonne	HP5MS 19091S-433	Lengde: 30 m Diameter: 0,25 mm	Agilent
Forvakuumpumpe	RV3 A65201903	-	Edwards
MS-detektor	Intelligence single Quadropole (ISQ)	-	Thermo Scientific
Software til GC-MS	Chromeleon™ 7	Versjon 7.2.10	Thermo Scientific Dionex

Tabell 2.7: Oversikt over analysebetingelser for GC-MS som ble benyttet i denne oppgaven.

Analysebetingelser	
<b>Prøvevolum</b>	2 µl
<b>Mobil fase</b>	Helium
<b>Vask av injektor før injeksjon</b>	1 x 5,0 µl butylacetat
<b>Vask av injektor etter injeksjon</b>	5 x 5,0 µl butylacetat
<b>Temperatur i ovn</b>	280 °C
<b>Injeksjonssystem</b>	Splitless
<b>Flow mobilfase</b>	1,0 mL/min
<b>Temperaturgradient (ovn)</b>	140,0°C: Holdes i 1 min
	300,0°C: Øker med 40 °C/min opp til 300,0°C og holdes i 10 min.
<b>Temperatur mellom GC og MS</b>	250 °C
<b>Temperatur ionekilde</b>	230 °C

### **Fremgangsmåte for sammenlikning av THC i standarder i serum og fullblod**

Ved sammenlikning av standarder i serum og fullblod, ble det benyttet en standardrekke med kontroller (tabell 2.2) i fullblod og en standardrekke og kontroller i serum. I tillegg ble det benyttet åtte prøver med varierende konsentrasjon innenfor måleområdet til analysen. Alle prøvene ble opparbeidet likt, som beskrevet ovenfor.

### **Fremgangsmåte for holdbarhetsundersøkelse av THC i fullblod**

Påvirkningen av tre omganger med frys og tin på THC-konsentrasjonen i prøvematerialet ble undersøkt ved å benytte tre paralleller av kontroller i høyeste nivå (nivå 7, tabell 2.2) og tre paralleller av kontroller i laveste nivå (nivå 5, tabell 2.2). THC konsentrasjon ble beregnet ved bruk av en standardrekke i fullblod (tabell 2.2.). Kontrollene ble fryst (-20°C, 1 t) og deretter tint (romtemperatur, 30 min) i tre omganger. Etter siste tining, ble de satt i fryseren over natten. Neste dag ble kontrollene tint og opparbeidet med væske-væske- og fast-fase ekstraksjon, i tillegg til derivatisering og analysering på GC-MS, som beskrevet tidligere i metoder. Standarder og kontroller ble opparbeidet likt.



## **Måleusikkerhet**

Det er ikke gjort beregninger av måleusikkerheten for analyse av cannabis i post-mortem prøver. Ved å se på måleusikkerheten for GC-MS analyse av THC i matrisen serum ved avdelingen kan man få en indikasjon på hvordan måleusikkerheten for metoden er. For analyse av THC i serum er måleusikkerheten 14% for lave verdier og 10% for høye verdier.

## 3 Resultater og diskusjon

3.1 Sammenlikning av resultater for THC ved standardkurver i serum og fullblod  
Starten av bachelorperioden var preget av mye instrumenttrøbbel. Dette gjorde at oppgaven ikke ble gjennomført slik som planlagt. En del av oppgaven var opprinnelig å gjennomføre en samkjøring av GC-MS B og GC-MS C, for å validere GC-MS C til analyse av cannabis i fullblod. Denne deloppgaven måtte strykes fordi GC-MS B ikke fungerte. Alle resultater i denne oppgaven er fra GC-MS C.

Instrumenttrøbbelet har også latt seg vise i svake signaler fra første analysedag, som har ført til gjennomgående dårligere resultater fra dag 1 sammenliknet med de andre dagene. Til tross for et lite samarbeidsvillig instrument har samtlige resultater tilfredsstilt sine respektive akseptkriterier, dette skyldes at internstandarder korrigerer godt for endringer underveis i analysen. Likevel er det begrenset hvor mye internstandarder kan korrigere for, da lavt signal fører til større variasjon og usikkerhet rundt målingene.

### 3.1.1 Vurdering av analyserespons

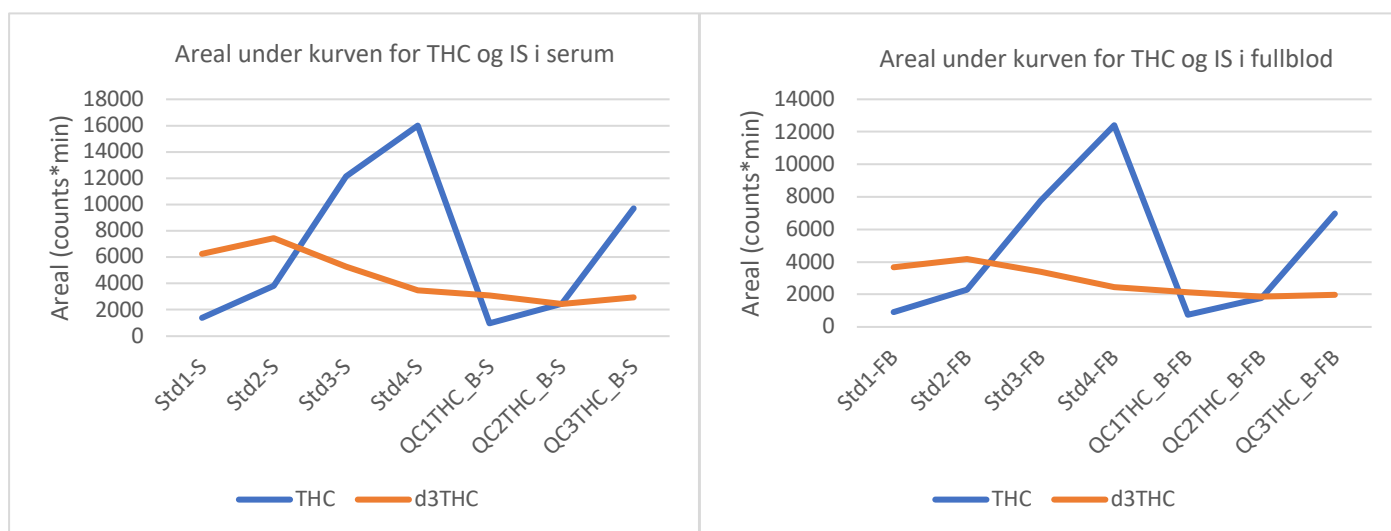
Analyttsignalet ble undersøkt ved å sammenlikne det totale arealet for alle standarder og kontroller i serum og fullblod. Det ble beregnet avvik (%) ved bruk av formel 2, med arealet fra fullblod satt som teoretisk verdi. Resultatene er satt inn i tabell 3.1. For en visuell fremstilling av resultatene, se vedlegg 2. Graf for dag 1 er vist i figur 3.1.

Tabell 3.1: Oversikt over areal under kurven for standarder og QC i serum og fullblod, med beregnet avvik (%) mellom det totale arealet for standarder og kontroller.

Nivå	Dag 1		Dag 2		Dag 3		Dag 4		Dag 5	
	Serum	Fullblod	Serum	Fullblod	Serum	Fullblod	Serum	Fullblod	Serum	Fullblod
<sup>1</sup> Std1	1400	900	4090	3089	4108	2508	5337	5978	5137	3471
Std2	3807	2291	8445	9040	8152	9106	14335	12132	11575	11033
Std3	12157	7753	45016	32434	46501	42863	71688	52743	53490	47292
Std4	16003	12406	106988	98234	96041	42690	156340	129933	108225	101012
<sup>2</sup> QC1	976	748	5212	3656	4614	4974	8241	8705	5367	5495
QC2	2439	1767	14590	10801	63853	54926	20827	23422	81882	20973
QC3	9716	6986	66850	38842	13927	14929	84892	103431	18027	48380
Sum/total areal	46498	32851	251191	196096	237196	171996	361660	336344	283703	237656
Avvik	41,5%		28,1%		37,9%		7,5%		19,4%	

<sup>1</sup> Std- standard

<sup>2</sup> QC- Kontroll



Figur 3.1: Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og internstandard i serum (venstre) og fullblod (høyre) for dag 1

Tabellen og beregning av avvik (%) viser at serum i snitt har et høyere areal under kurven enn fullblod for alle fem dagene. At serum har et høyere signal kan skyldes at serum er en mindre kompleks matriks enn fullblod. Når disse to matriksene gjennomgår lik prøveopparbeidelse, vil muligens serumprøvene få et renere sluttprodukt. På dag 1 kan man se at arealet er betydelig lavere enn de andre dagene. Det er også en større differanse i areal mellom serum og blod på dag 1.

Diagrammene i vedlegg 2 viser grafer for arealene under kurven til THC og internstandard (IS) i standarder og kontroller for dag 1-5. I diagrammene ser man en økning i areal under kurven med økende konsentrasjon av THC i både standarder og kontroller. Arealet til IS ligger jevnt gjennom hele analyseserien alle dagene, med unntak av dag 1 (figur 3.1). Arealet for IS på dag 1 viser en synkende trend utover i analyserekken. Hvis man vurderer tabell 3.1, kan man også her se en synkende trend for arealet til THC gjennom analyseserien. Denne trenden blir ikke like tydelig i diagrammet, da standarder og kontroller ikke inneholder samme konsentrasjon av THC. Man vil derfor ikke se den samme synkende trenden ved visuell vurdering. Denne trenden vil ikke påvirke prøveresultatene, siden IS kompenserer for den varierende responsen.

Internstandarder ligger jevnt for alle dagene, med unntak av en noe synkende trend dag 1. Analyseresponsen til THC i standarder og kontroller i serum er høyere enn for THC i fullblod. Totalt analyttsignal for serum er  $\geq 7,5\%$  sammenlignet med fullblod.

#### 3.1.1 Laveste kvantifiseringsgrense (LOQ)

For å vurdere LOQ ble S/N-ratio til standard 1 undersøkt. S/N-ratioen til kvantifiserings- og kvalifiseringsionet til THC for standard 1 ble beregnet for dag 1-5 og er presentert i tabell 3.2. Resultatene til standard 0 ble kontrollert for å se at det ikke var detektert noe THC i nullprøven. Disse resultatene er satt inn i tabell 3.3. I tillegg ble det gjort en visuell vurdering av kromatogrammene til standard 0 og standard 1 i serum for å se om det var interfererende topper i standard 0 som kunne påvirke kvantiteringen av THC. Kromatogram 1-5 presentert i vedlegg 3 viser standard 0 (blå) mot standard 1 (svart), for hhv. dag 1-5.

Tabell 3.2: S/N-ratio for kvalifiseringsion og kvantifiseringsion til THC i standard 1.

A) <sup>3</sup>		
S/N for THC i serum		
Analysedag	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
Dag 1	64	64
Dag 2	279	159
Dag 3	470	188
Dag 4	218	218
Dag 5	257	257
B) <sup>4</sup>		
S/N for THC i fullblod		
Analysedag	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
Dag 1	33	33
Dag 2	121	208
Dag 3	625	632
Dag 4	361	361
Dag 5	237	237

<sup>3</sup> S/N-ratio for THC i serum standard 1

<sup>4</sup> S/N-ratio for THC i fullblod standard 1

Tabell 3.3: Interferens undersøkt ved vurdering av konsentrasjon og areal under kurven for THC i serum standard 0 og standard 1

Analysedag	Prøve ID	Konsentrasjon THC	Areal THC (signal)	% av std 1
		ng/mL	counts*min	
Dag 1	Standard 0	<sup>5</sup> n.s	n.s	0 %
	Standard 1	1,0	1400	
Dag 2	Standard 0	n.s	n.s	0 %
	Standard 1	0,9	4090	
Dag 3	Standard 0	n.s	n.s	0 %
	Standard 1	1,0	4108	
Dag 4	Standard 0	n.s	n.s	0 %
	Standard 1	1,0	5337	
Dag 5	Standard 0	n.s	n.s	0 %
	Standard 1	1,0	5137	

<sup>5</sup> n.s - No signal: indikerer at det ikke er registrert noen topper med retensjonstid (RT) lik THC

Tabell 3.2 viser at S/N-ratio til standard 1 i serum og i fullblod for samtlige dager er innenfor kravet for kvantifiseringsionet og kvalifiseringsionet, på henholdsvis  $\geq 30$  og  $\geq 10$ . Ved høyere S/N-ratio, vil støy i kromatogrammet ha mindre innvirkning på resultatet. S/N-ratio for de ulike matriksene er ikke like, men det er ingen trend for at serum gir høyere S/N-ratio enn fullblod.

Tabell 3.3 viser at det ikke ble detektert THC i standard 0. Visuell vurdering av kromatogrammene i vedlegg 3 viser at det ikke var interfererende toppler i området rundt forventet RT for THC i standard 1.

I tabell 3.2 A og B ser man at resultatet fra dag 1 er lavere enn for de resterende dagene. Ved vurdering av arealet i tabell 3.3 ser man at signalstyrken fra dag 1 også er betydelig lavere. Det lave arealet detektert på dag 1 er sannsynligvis årsaken til den lave S/N-ratioen. S/N er et tall som viser forholdet mellom signal og støy. Dersom signalet blir lavere, men støyen forblir konstant, vil forholdet bli lavere. Ved en vurdering av rådata (vedlegg 6), kan man også se at resultatene fra dag 1 har større avvik enn resultatene fra de andre dagene. Dette kan ha sammenheng med den lave signalstyrken og den lave S/N-ratioen.

Undersøkelse av laveste kvantifiseringsgrense viser at S/N-ratioen for standard 1 i serum er innenfor akseptkriteriene for alle dagene. Det ble ikke funnet noen interfererende toppler i standard 0 som kan påvirke kvantiteringen av THC. Dette viser at dersom man skal gå over til å benytte standarder i serum, kan man benytte samme LOQ som brukes for standarder i fullblod.

### 3.1.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet

For å undersøke reproduserbarhet ble kontroller i tre nivåer (tabell 2.2), både i serum og fullblod, analysert over fem ulike dager. Deretter ble THC nivåene kvantitert ved bruk av serumstandardkurve og fullblodstandardkurve. Det ble beregnet CV (%), ved bruk av formel 1. Nøyaktigheten ble vurdert ved å beregne avvik (%) fra den teoretiske verdien ved bruk av formel 2. Resultatene er presentert i tabellene 3.4, 3.5 og 3.6 nedenfor.

Tabell 3.4: Reproduserbarhet for bestemmelse av THC i fullblod uttrykt som CV (%) og avvik i nøyaktighet (%) med standardkurve i fullblod.

	THC i fullblod avlest på fullblodkurve		
	QC1 (1,5 ng/mL)	QC2 (5,0 ng/mL)	QC3 (20,0 ng/mL)
Dag 1	1,6	4,6	17,8
Dag 2	1,4	4,8	19,2
Dag 3	1,4	5,0	19,8
Dag 4	1,5	5,2	19,4
Dag 5	1,4	4,7	19,4
Gjennomsnitt	<b>1,5</b>	<b>4,9</b>	<b>19,1</b>
SD	0,09	0,24	0,77
%CV	<b>6,1</b>	<b>5,0</b>	<b>4,0</b>
Teoretisk verdi	1,5	5,0	20,0
<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>-2,7</b>	<b>-2,8</b>	<b>-4,4</b>

Tabell 3.5: Reproduserbarhet for bestemmelse av THC i fullblod uttrykt som CV (%) og avvik i nøyaktighet (%) med standardkurve i serum.

	THC i fullblod avlest på serumkurve		
	QC1 (1,5 ng/mL)	QC2 (5,0 ng/mL)	QC3 (20,0 ng/mL)
Dag 1	1,7	5,0	19,0
Dag 2	1,4	4,8	19,0
Dag 3	1,4	5,0	19,8
Dag 4	1,4	5,2	19,4
Dag 5	1,4	4,8	19,8
Gjennomsnitt	<b>1,5</b>	<b>5,0</b>	<b>19,4</b>
SD	0,1	0,17	0,40
%CV	<b>9,2</b>	<b>3,4</b>	<b>2,1</b>
Teoretisk verdi	1,5	5,0	20,0
<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>-2,7</b>	<b>-0,8</b>	<b>-3,0</b>

Tabell 3.6: Reproduserbarhet for bestemmelse av THC i serum uttrykt som CV (%) og avvik i nøyaktighet (%) med standardkurve i serum.

	THC i serum avlest på serumkurve		
	QC1 (1,5 ng/mL)	QC2 (5,0 ng/mL)	QC3 (20,0 ng/mL)
Dag 1	1,5	5,2	17,9
Dag 2	1,5	5,0	19,2
Dag 3	1,4	5,2	19,6
Dag 4	1,4	5,5	19,5
Dag 5	1,4	5,3	19,5
Gjennomsnitt	<b>1,4</b>	<b>5,2</b>	<b>19,1</b>
SD	0,05	0,18	0,71
%CV	<b>3,8</b>	<b>3,5</b>	<b>3,7</b>
Teoretisk verdi	1,5	5,0	20,0
<b>Nøyaktighet (% avvik)</b>	<b>-4,0</b>	<b>4,8</b>	<b>-4,3</b>

Tabell 3.4 tilsvarer standardkurven som brukes i rutinen per i dag, og benyttes som en referanse i sammenlikningen. Samtlige resultater i tabell 3.4-3.6 tilfredsstillende akseptkriteriene for nøyaktighet (avvik  $\leq 15\%$ ) og har CV  $\leq 15\%$ .

Ved å sammenligne nøyaktigheten og CV i tabell 3.4 med resultatene i tabell 3.5 er det ingen forskjell i nøyaktigheten ved avlesning. De forskjellene man kan se på CV og nøyaktighet skyldes metodens måleusikkerhet. CV for QC1 er noe høyere, men dette skyldes en høyere verdi fra dag 1. En overgang til serumstandardkurve betyr også en overgang til QC-er i serum, og kontrollene i fullblod forsvinner. Det er derfor viktig å dokumentere effekten av en overgang vil ha på analysesvaret til THC i fullblod. Dette gir et bilde på hvordan en standardkurve i serum vil påvirke resultatene av THC i fullblodprøver.

Resultatene viser at reproduserbarheten, målt som CV og avvik (%) fra teoretisk verdi, var innenfor fastsatte akseptkriterier. Reproduserbarheten for standarder og kontroller beregnet med standardkurve i serum hadde en CV  $\leq 9,2\%$  og avvik  $\leq 4,8\%$ . Dette viser at variasjonen dag til dag er liten.

#### 3.1.4 Kurvetilpasning

Standardkurver ble laget ved bruk av standarder i serum og formel 3. Om serum standardrekker kan benyttes til analyse av fullblod ble undersøkt ved å analysere standardrekker i serum og i fullblod (tabell 2.2) over fem dager. Deretter ble THC konsentrasjon beregnet ved bruk av standardrekke i serum, og avvik (%) fra teoretisk verdi beregnet. Resultatene er presentert i tabell 3.7 og tabell 3.8 nedenfor.



Tabell 3.7: Avvik (%) fra teoretisk verdi for standarder og kontroller i fullblod ved bruk av standardrekke i serum.

Navn	Type	Fasit	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Gjennomsnitt avvik
		ng/mL	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik
Std1-FB <sup>6</sup>	Standard	1,0	10,3	4,3	-5,1	-8,1	-3	-0,1
Std2-FB	Standard	2,5	10,4	3,2	8,3	-2,3	2,9	4,2
Std3-FB	Standard	12,5	-1,3	-0,3	9,3	-0,5	0,7	3,4
Std4-FB	Standard	25,0	10,2	-1,0	-5,2	0,3	-0,5	4,8
QC1-FB	Kontroll	1,5	12,2	-6,2	-7,3	-4,4	-6	-1,7
QC2FB	Kontroll	5,0	-1,0	-3,5	-1,0	3,5	-5,4	-0,4
QC3-FB	Kontroll	20,0	-5,0	-4,8	-1,1	-2,9	-3,1	0,5

<sup>6</sup> FB - Fullblod

Tabell 3.8: Avvik (%) fra teoretisk verdi for standarder og kontroller i serum ved bruk av standardrekke i serum.

Navn	Type	Fasit	Dag 1	Dag 2	Dag 3	Dag 4	Dag 5	Gjennomsnitt avvik
		ng/mL	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik	%avvik
Std1-S <sup>7</sup>	Standard	1,0	-1,7	-2,1	-1,7	-4,8	-0,1	-1,6
Std2-S	Standard	2,5	2,2	0,7	1,5	4,4	1,7	2,2
Std3-S	Standard	12,5	-0,8	2,9	0,7	1,3	-0,5	2,7
Std4-S	Standard	25,0	0,2	-1,4	-0,4	-0,9	-3,3	3,2
QC1-S	Kontroll	1,5	-0,9	1,1	-6,1	-6,1	-4,5	-2,5
QC2-S	Kontroll	5,0	4,4	0,8	4,5	9,6	-4,8	3,3
QC3-S	Kontroll	20,0	-10,6	-4,0	-2,0	-2,4	4,9	1,0

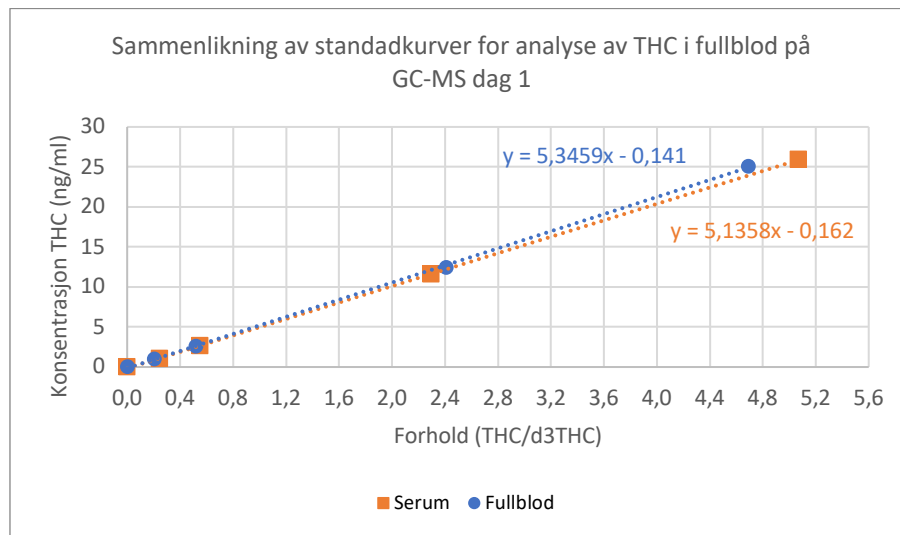
<sup>7</sup> S - Serum

Tabell 3.7 og tabell 3.8 viser at samtlige resultater tilfredsstillende akseptkriteriet på  $\leq 20\%$  avvik fra teoretisk verdi. Avvikene i tabellene er såpass lave, med avvik  $\leq 12,2\%$ . Disse avvikene kan skyldes metodens usikkerhet. Ved å se på signalstyrken i tabell 3.1, ser man at arealene har store variasjoner fra dag til dag. Resultatene er likevel tilnærmet like, som viser at IS korrigerer bra.

Gjennomsnittlig avvik fra teoretisk verdi beregnet ved bruk av standardkurve i serum er  $\leq 4,8\%$ . Dette viser at metoden har god riktighet.

### 3.1.5 Sammenlikning av standardkurver for THC i serum og fullblod

Til vurdering og sammenlikning av standardkurver i serum og fullblod ble det brukt resultater fra analysing av standardrekkene dag 1-5. En kurve fra standarder i fullblod og en kurve fra standarder i serum ble laget etter formel 3 og samlet i et diagram for hver dag. De to kurvene ble undersøkt visuelt etter forskjeller. Figur 3.2 viser diagrammet for dag 1 og de resterende diagrammene er vedlagt i vedlegg 4.



Figur 3.2: Standardkurver til bestemmelse av THC i fullblod ved bruk av standardrekke i fullblod og i serum.

Standardkurven for bestemmelse av THC i fullblod er en lineær kurve (se figur 3.2). Kurven er lineær i hele måleområdet, [1,0 – 25,0] ng/mL. I diagrammene er det ingen betydelig forskjell på kurvene som ble laget av resultater fra dag 1-5. Dette sees også i likningen  $y=ax+b$ , der det vises at det er minimal forskjell på kurvene i de ulike matriksene. Den proporsjonale forskjellen mellom kurvene er minimal for det aktuelle måleområdet og den konstante forskjellen er helt ubetydelig.

32 tillagde prøver med ukjent konsentrasjon ble analysert i løpet av de fem analysedagene. THC konsentrasjonen ble bestemt både ved bruk av serumstandardkurve og fullblodstandardkurve. Avviket mellom konsentrasjonene ble beregnet som vist i formel 2, ved å bruke resultatene med fullblodstandardrekke som referanseverdi. Resultatene ligger vedlagt i vedlegg 5.

Resultatene i vedlegg 5 viser at avviket på samtlige prøver er innenfor akseptkriterium på  $\leq 15\%$ . De åtte prøvene med høyest avvik er de åtte prøvene som ble analysert første dag. Alle

resultatene fra denne dagen bærer preg av å ha et høyere avvik enn de etterfølgende dagene. Resultatene viser at bruk av serumstandardkurve gir THC-resultater som samsvarer godt med fullblodstandardkurven.

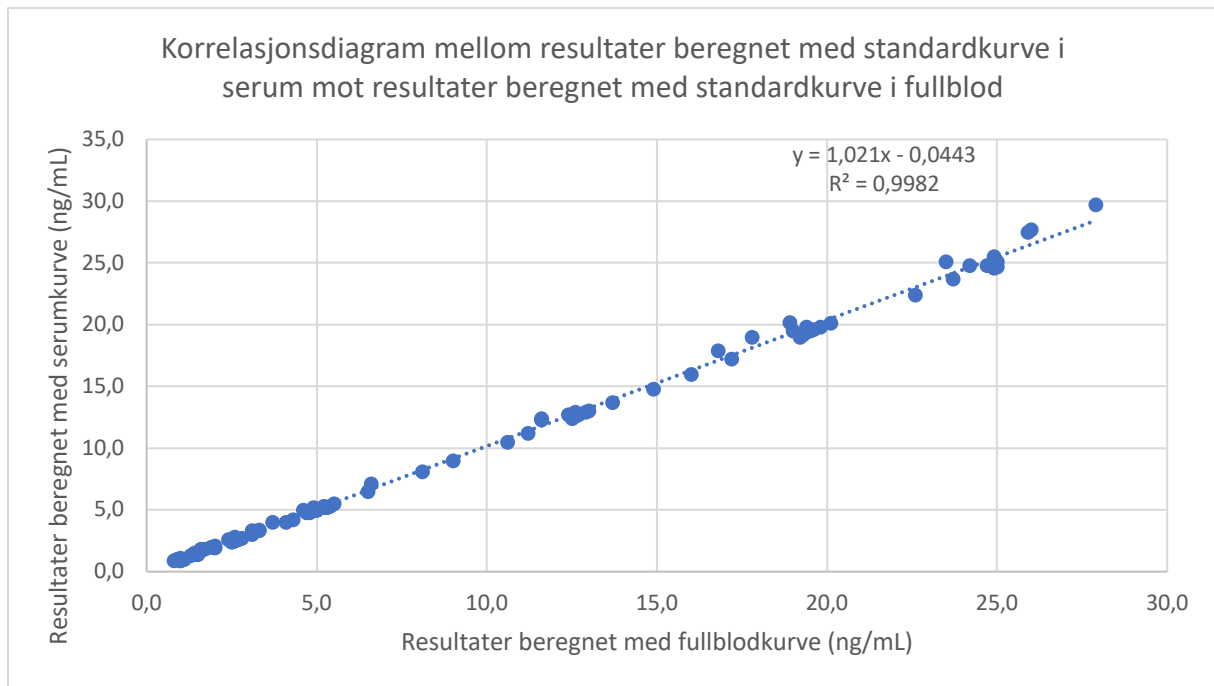
Visuell sammenlikningen av standardkurvene i serum og fullblod viser at de er like. Resultatene på de 32 prøvene viser godt samsvar mellom de to standardkurvene. Basert på disse resultatene kan standardkurve i serum benyttes ved analyse av THC i fullblod.

### 3.1.6 Korrelasjon mellom standardkurver for THC i serum og fullblod

Til vurdering av korrelasjon mellom standardkurver i serum og fullblod, ble alle resultater beregnet med standardkurve i serum sammenliknet med alle resultater beregnet med standardkurve i fullblod. Det ble gjennomført en regresjonsanalyse i Excel, og laget et korrelasjonsdiagram. Resultater for regresjonsanalysen er presentert i tabell 3.9 og korrelasjonsdiagrammet er presentert i figur 3.3.

*Tabell 3.9: Regresjonsanalyse for bestemmelse av korrelasjonen mellom standardkurve i serum og i fullblod.*

$Y = 1,021x - 0,0443$	
X-variabel	Resultater beregnet med fullblodkurve
Y-variabel	Resultater beregnet med serumkurve
Systematisk forskjell	
Skjæringspunkt (b)	-0,0443 ng/mL
95% KI	-0,1530 – 0,0644 ng/mL
Proporsjonal forskjell	
Stigningstall (a)	1,021 ng/mL
95% KI	1,0123 – 1,0297 ng/mL



Figur 3.3: Korrelasjonsdiagram for å sammenlikne resultater beregnet med standardkurve i serum og standardkurve i fullblod. Den blå stiplede linjen er regresjonslinjen.

I korrelasjonsdiagrammet (figur 3.3) ligger alle resultatene tett på regresjonslinjen. Korrelasjonskoeffisienten  $r$  er 0,9991. Siden  $r$  er nært 1, viser det at det er en god lineær sammenheng mellom resultatene beregnet med de to standardkurvene.

Regresjonsdata i tabell 3.9 viser forskjellen mellom standardkurve i serum og standardkurve i fullblod. 0 er innenfor 95% konfidensintervall (KI) for skjæringspunktet (b) det er ikke noen statistisk signifikant konstant forskjell mellom de to standardkurvene. 1 er ikke innenfor 95% KI for stigningstallet (a); det er en proporsjonal forskjell mellom standardkurvene. Siden  $a$  er over 1, tyder det på at standardkurven i serum proporsjonalt vil gi litt høyere resultater enn standardkurven i blod. Dette er også synlig i korrelasjonsdiagrammet som viser større spredning mellom verdiene ved høyere konsentrasjoner. 95% KI til stigningstallet er så smalt at stigningstallet i praksis er 1, og selv om det statistisk sett er en forskjell så er denne forskjellen ikke klinisk relevant.

Det er mye usikkerhet rundt målingene av THC i post-mortem blod, slik at den proporsjonale forskjellen vil ha liten betydning. Post-mortem vil blodet koagulere og fordele seg ujevnt i kroppen, i tillegg kan en omfordeling av THC forekomme. Dermed er det ikke sikkert den delen man veier ut for analyse har lik konsentrasjon av THC som resten av blodet. Dette gjør det

vanskelig å si med sikkerhet hva konsentrasjonen var i det døden inntraff. Siden det ikke er noen konstant forskjell mellom de to standardkurvene, skal det ikke være mulig å utgi falske positive svar ved bruk av serumkurve istedenfor blodkurve.

I korrelasjonsdiagrammet vises ingen forskjell mellom kurvene, og de vil gi like resultater. Beregnet r-verdi viser tilfredsstillende korrelasjon mellom standardkurvene.

### 3.1.7 Bland-Altman plott

For å vurdere forskjeller mellom resultater beregnet med serumkurve og fullblodkurve i hele måleområdet, ble det laget et Bland-Altman plott, vist i figur 3.4. Plottet gir en visuell presentasjon av differansen (%) mellom resultat beregnet med serumstandarder og fullblodstandarder, med fullblodstandarder satt som referanseverdi. Det er plottet inn resultater fra alle QC og prøver, med unntak av QC som ble frosset og tint i holdbarhetsstudien. Rådata kan finnes i tabellene i vedlegg 7.



Figur 3.4: Bland-Altman plott for avlesning på serumkurve. Den grønne linjen viser gjennomsnittlig forskjell (%) ift. blodkurve. De oransje linjene tilsvare 95% konfidensintervall for avviket (%). Rød linje viser grense for tillatt avvik (%).

Plottet viser at gjennomsnittslinjen, gjennomsnittet for avvikene, ligger rett over null-linjen. Dette viser at det er en positiv differanse mellom standardkurvene, som indikerer at standardkurven i serum gir noe høyere resultater. Plottet viser også en større spredning i de lave konsentrasjonsområdene sammenlignet med de høye. På plottet kan man se at alle resultater beregnet med serum avviker <20% fra resultatene beregnet med fullblod, og alle resultatene, med unntak av ett, ligger innenfor 95% KI.

Bland-Altman plottet viser ingen klinisk signifikant forskjell mellom de to standardkurvene.

### 3.2 Undersøkelse av konsentrasjonsendring etter tre tin/frys-sykluser

Resultatene fra holdbarhetsundersøkelsen av THC i fullblod ved tre omganger med frys og tin er samlet i tabell 3.10. CV (%) ble beregnet ved bruk av formel 1, nøyaktighet ble beregnet ved bruk av formel 2 og relativt avvik ble beregnet ved bruk av formel 4.

Tabell 3.10: Målte verdier for THC i fullblod-kontroller (QC1 og QC3) etter tre tin og frys sykluser. Resultatene er uttrykt som CV (%) og avvik (%).

	THC i fullblod	
	QC1 (1,5 ng/mL)	QC3 (20,0 ng/mL)
Parallell 1	1,5	18,4
Parallell 2	1,4	19,6
Parallell 3	1,4	18,9
Gjennomsnitt	1,4	18,9
SD	0,03	0,59
<b>CV (%)</b>	<b>1,8</b>	<b>3,1</b>
Referanseverdi <sup>8</sup>	1,41	19,38
<b>Relativt avvik (%)<sup>9</sup></b>	<b>1,2</b>	<b>-2,3</b>
Teoretisk verdi	1,5	20,0
<b>Nøyaktighet (% avvik)<sup>10</sup></b>	<b>-4,9</b>	<b>-5,4</b>

<sup>8</sup> Resultat fra ikke-frost QC analysert i samme analyserekke

<sup>9</sup> Avvik fra ikke-frost QC analysert i samme analyserekke

<sup>10</sup> Avvik fra teoretisk verdi

Begge kontrollene er innenfor akseptkriteriet for  $CV \leq 15\%$  og relativt avvik  $\leq 20\%$ . Det største relative avviket var på -2,3%. Lav CV for QC1 og QC3 viser at det ikke er gjort noen tilfeldige feil underveis som kan ha påvirket resultatene eller tolkningen av disse. CV for parallellene var  $\leq 3,1\%$ .

Det ble gjort noen observasjoner under gjennomføringen av holdbarhetsundersøkelsen som kan gjøre det interessant med videre undersøkelser. Etter sentrifugering under væske-væske ekstraksjonen, ble det observert at det ikke var et tydelig skille mellom det organiske løsemiddelet og prøvematerialet på de prøvene som hadde vært frosset, i motsetning til prøver som ikke hadde vært frosset. Dette gjorde det vanskeligere å separere de to fasene. Ved inndamping ble det observert hvitt belegg på innsiden av spissglassene til de frosne prøvene. Det samme belegget ble ikke observert på de ikke frosne prøvene. Siden holdbarhetsundersøkelsen kun ble utført over én dag kan det ikke sies noe mer om årsaken til disse observasjonene. Det kan ikke utelukkes om dette var en tilfeldig observasjon, og det er usikkert om det kan påvirke metoden.

Resultatene ble ikke som forventet, da det på forhånd var antatt at konsentrasjonen av THC i fullblod ville synke etter å ha blitt tint og frosset gjentatte ganger. Basert på resultatene, har ikke frysing noen innvirkning på konsentrasjonen av THC i fullblodsprøver.

## 4 Konklusjon

### **Sammenlikning av resultater med serumkurve og fullblodkurve**

Overgang fra standardkurve i fullblod til serum viser en økning i signalstyrken for THC.

S/N-ratioen for standard 1 ved overgang til serum er innenfor akseptkriteriene, og i samme størrelsesorden som blod. Det ble ikke funnet interfererende topper i standard 0. Dette viser at man kan benytte samme LOQ for standardrekke i serum som i fullblod.

Resultatene for reproduserbarhet var innenfor fastsatte akseptkriterier på  $CV \leq 15\%$  og avvik  $\leq 15\%$ . Dette viser at variasjonen fra dag til dag er liten. Analyse av THC i fullblodsprøver viser god presisjon og nøyaktighet når standardkurve i serum benyttes.

Gjennomsnittlig avvik beregnet ved bruk av standardkurve i serum er innenfor akseptkriteriet på  $\leq 20\%$ .

Sammenlikningen av standardkurvene i serum og fullblod viser at det er liten forskjell mellom kurvene. Beregnet r-verdi på 0,9991 viser god korrelasjon mellom standardkurvene.

Standarder i fullblod kan erstattes med standarder i serum for analyse av THC i fullblod.

### **Holdbarhetsundersøkelse av konsentrasjonen av THC i fullblod etter tin og frys sykluser**

Det var ingen tegn til degradering av THC i blodprøvene etter tre tin og frys sykluser.

Det ble observert at prøvematerialet som hadde vært tint og frosset oppførte seg litt annerledes under prøveopparbeidelsen enn prøver som ikke hadde vært frosset.

På grunnlag av resultatene fra holdbarhetsundersøkelsen, kan man si at gjentatte omganger med frysing og tining av prøver i fullblod ikke har noen signifikant innvirkning på konsentrasjonen av THC. Observasjoner under prøveopparbeidelsen kan gjøre det aktuelt med videre undersøkelser.



## 5 Referanser

1. Bretteville-Jensen AL, redaktør. Hva vet vi om cannabis? 1. utg. Universitetsforlaget; 2013.
2. Hva sier loven om cannabis [Internett]. Rusinfo. [sitert 28. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://rusinfo.no/fakta-om-rusmidler/fakta-om-cannabis/sier-loven-cannabis/>
3. Khiabani HZ, Mørland J. Cannabis og cannabinoider som legemidler. Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 1. mars 2007 [sitert 24. mars 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2007/03/oversiktsartikkel/cannabis-og-cannabinoider-som-legemidler>
4. Nilssen EB. GCISQ: Metodebeskrivelse THC i fullblod - EQS (35936). Avdeling for klinisk farmakologi; 2022.
5. Nilssen EB. GCISQ: Metodebeskrivelse THC i serum - EQS (37102). Avdeling for klinisk farmakologi; 2022.
6. Westin AA. Cannabis og urinprøver. Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 18. mars 2011 [sitert 13. mars 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2011/03/oversiktsartikkel/cannabis-og-urinprover>
7. Schurman LD, Lu D, Kendall DA, Howlett AC, Lichtman AH. Molecular Mechanism and Cannabinoid Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol*. 2020;258:323–53.
8. Rifai N, Horváth AR, Wittwer CT. *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics*. Eighth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019.
9. Greibrokk T. Kromatografi: separasjon og deteksjon [Internett]. Oslo: Pensumtjeneste; 2005 [sitert 28. mars 2023]. 300 s. Tilgjengelig på: [https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb\\_digibok\\_2012042705082](https://urn.nb.no/URN:NBN:no-nb_digibok_2012042705082)
10. Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfennig A. Liquid–Liquid Extraction. I: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [Internett]. John Wiley & Sons, Ltd; 2008 [sitert 14. mars 2023]. s. 250–1, 294–5. Tilgjengelig på: [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/14356007.b03\\_06.pub2](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/14356007.b03_06.pub2)
11. Raynie D, Watson DW. Understanding and Improving Solid-Phase Extraction. *LCGC N Am*. 1. desember 2014;32(12):908–15.
12. Hübschmann HJ. *Handbook of GC/MS: fundamentals and applications*. 2nd, completed rev. and updated ed utg. Weinheim: Wiley-VCH; 2009. 719 s.
13. PubChem. Bstfa [Internett]. [sitert 13. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94358>

14. Moldoveanu SC, David V, Moldoveanu SC, David V. Derivatization Methods in GC and GC/MS. I: Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application [Internett]. IntechOpen; 2018 [sitert 13. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.intechopen.com/chapters/64643>
15. Clarke W. Chapter 1 - Mass spectrometry in the clinical laboratory: determining the need and avoiding pitfalls. I: Nair H, Clarke W, redaktører. Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory [Internett]. San Diego: Academic Press; 2017 [sitert 14. mars 2023]. s. 1–15. Tilgjengelig på: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008713000018>
16. Butterfield A, Szymanski J. electron multiplier. I: A Dictionary of Electronics and Electrical Engineering [Internett]. Oxford University Press; 2018 [sitert 23. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.oxfordreference.com/display/10.1093/acref/9780198725725.001.0001/acref-9780198725725-e-1517>
17. Fu Y, Barkley D, Li W, Picard F, Flarakos J. Evaluation, identification and impact assessment of abnormal internal standard response variability in regulated LC–MS bioanalysis. *Bioanalysis*. april 2020;12(8):545–59.
18. Uhrovčík J. Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects | Elsevier Enhanced Reader [Internett]. [sitert 14. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0039914013008710?token=DCF33D87C71362D671AD96F8C3A77C3898D4D23096E3D2C7AE460B28C5AE02E0E6803AC6ADCDE96E36D1AE13FA2F9D8B&originRegion=eu-west-1&originCreation=20230314122523>
19. Andreassen TN. Plan for tilleggs-validering THC i fullblod GC-MS. St. Olavs Hospital, Avdeling for klinisk farmakologi (AKF);
20. Løvås GG. Statistikk for universiteter og høyskoler. 4. utg. Oslo: Universitetsforl; 2018. 584 s.
21. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Medica*. 2015;25(2):141–51.

## 6 Vedlegg

**Vedlegg 1:** side 43 – 44

Flytskjema for prøveopparbeidelse ved analyse av THC i fullblod

**Vedlegg 2:** side 45 – 46

Visuell fremstilling av signal for THC og internstandard

**Vedlegg 3:** side 47

Kromatogrammer for undersøkelse av interfererende topper i serum standard 0

**Vedlegg 4:** side 48

Sammenlikning av standardkurver laget med standarder i serum og i fullblod

**Vedlegg 5:** side 49

Avvik (%) for ukjente prøver beregnet med standardkurve i serum og fullblod

**Vedlegg 6:** side 50 – 54

Rådata fra analysering dag 1-5, som er brukt til beregning av resultater

**Vedlegg 7:** side 55 – 56

Data benyttet for å lage Bland-Altman plott

**Vedlegg 1:** Flytskjema for prøveopparbeidelse før analyse av THC i fullblod på GC-MS.

## FLYTSKJEMA THC i fullblod, SPE

### Prøvepreparering

1,0 ml ferdig pipetterte standarder, interne kontroller (QC)  
1,0ml prøve (fullblod, unntatt RM-blod som veies inn)



50µl internstandard,  $\Delta^9$ -THC-D3 (0,1µg/ml) tilsettes  
Blandes i 10 sek på håndmikser



6ml n-pentan tilsettes  
Korkes og vippes i 10 min  
(Start kondisjonering av kolonner)



Fjern korkene  
Sentrifugering, 4700 rpm i 10 min  
(Sentrifugen er plassert på FOU- lab)



### SPE- kolonne ekstraksjon <sup>u</sup>/vakuum

(Dvs. at kolonnefiltrene kan stå uten væske i en liten periode)

#### 1. Kondisjonering (kun gravitasjon):

Benytt ekstraksjonskolonnen NH<sub>2</sub>-Bond Elut (100 mg, 10 ml)  
Tilsett 2 ml n-pentan



#### 2. Prøvetilsetning (kun gravitasjon):

Prøvematerialet (organiske fasen, øverst) overføres med pasteurpipette til *Bond Elut*- kolonnen. La hele prøvematerialet gå inn i filteret (SP) før vasking.



#### 3. Vasking (kun gravitasjon):

Vask 1: 2 ml n-pentan  
Vask 2: 4 ml n-pentan <sup>m</sup>/ 4 % etylacetat (lages samme dag)



#### 4. Eluering (kun gravitasjon):

Bytt til spissglass, før elueringstrinnet utføres.  
Tilsett 4 ml n-pentan <sup>m</sup>/ 7 % etylacetat (lages samme dag)



**Inndamping** ved bruk av N<sub>2</sub>-gass

**NB!** UTEN varme på varmeblokken

↓ **forts. neste side**

### Derivatisering

35 µl BSTFA m/ Acetonitril (1+2, lages samme dag) tilsettes  
Kork spissglassene

Derivatiseres i 15 min, 70 °C  
avkjøles til romtemperatur (med korkene på glassene)



**Inndamping** ved bruk av N<sub>2</sub>-gass  
**NB!** UTEN varme på varmeblokken

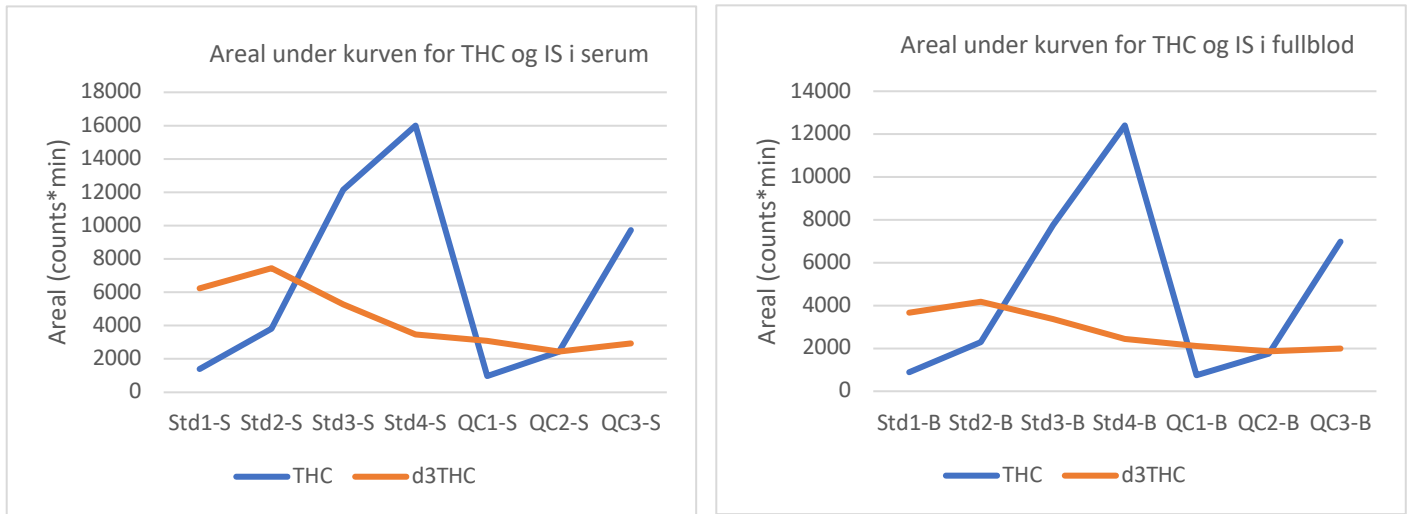


Løses i 30 µl butylacetat og kork spissglassene  
La stå med kork i 20min (+/- 5min)

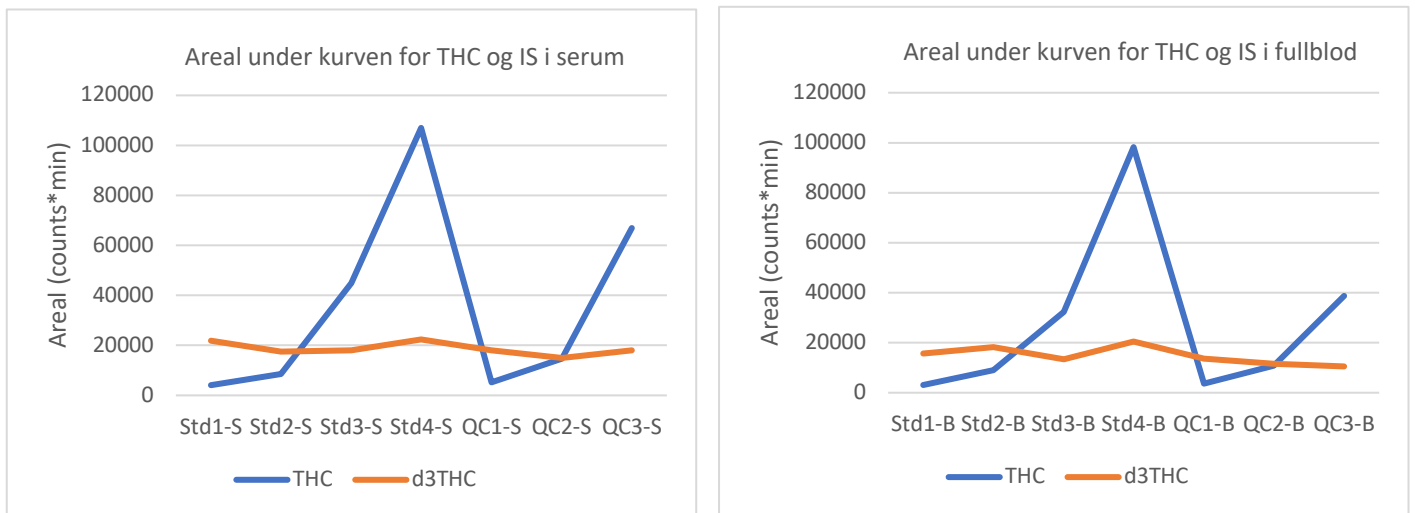


**Overføres til vials med inserts**

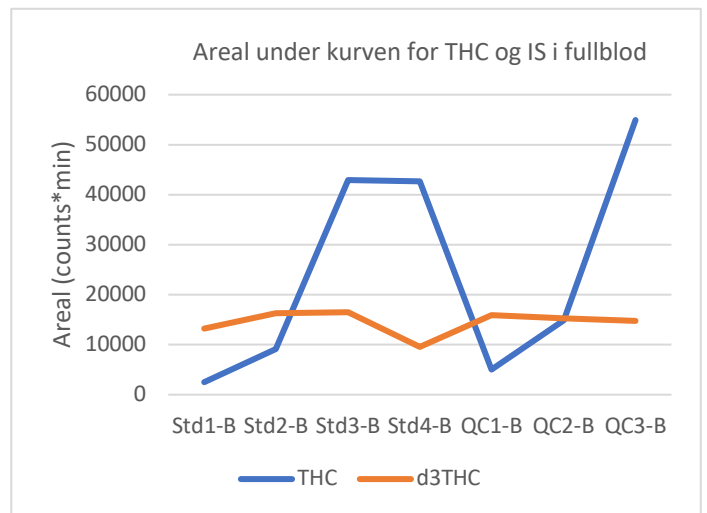
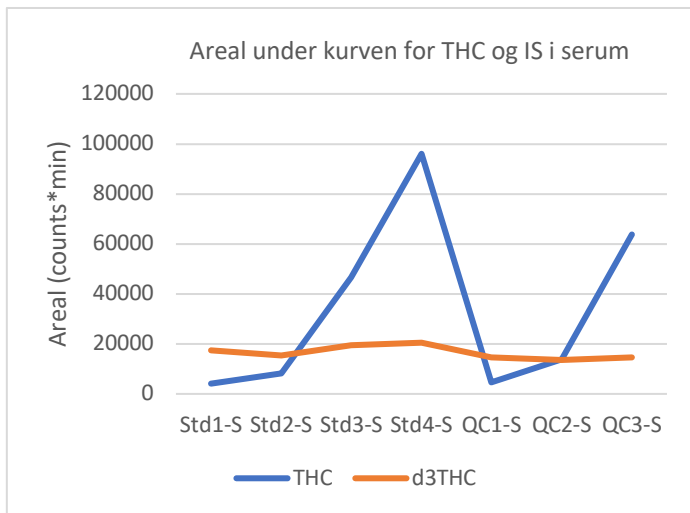
## Vedlegg 2: Visuell fremstilling av signal for THC og internstandard



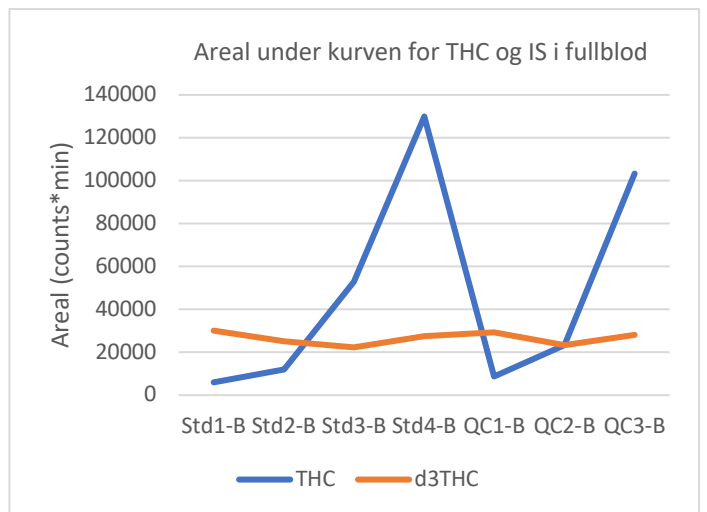
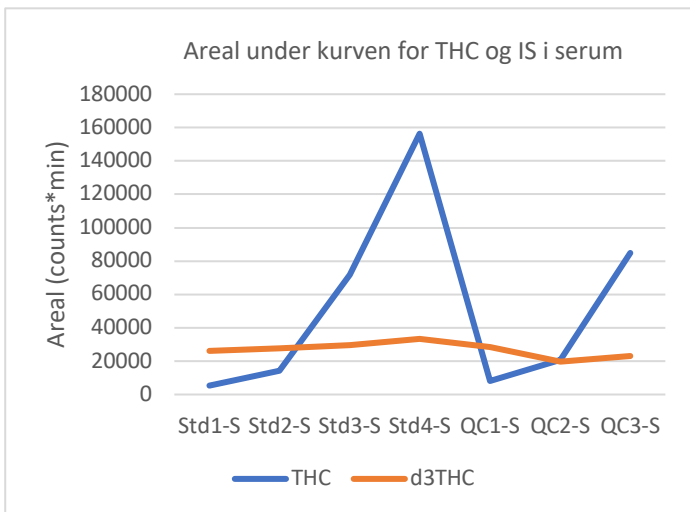
Figur 6.2.1: Dag 1 - Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og IS i serum og fullblod. Disse tilsvarer figur 3.1.



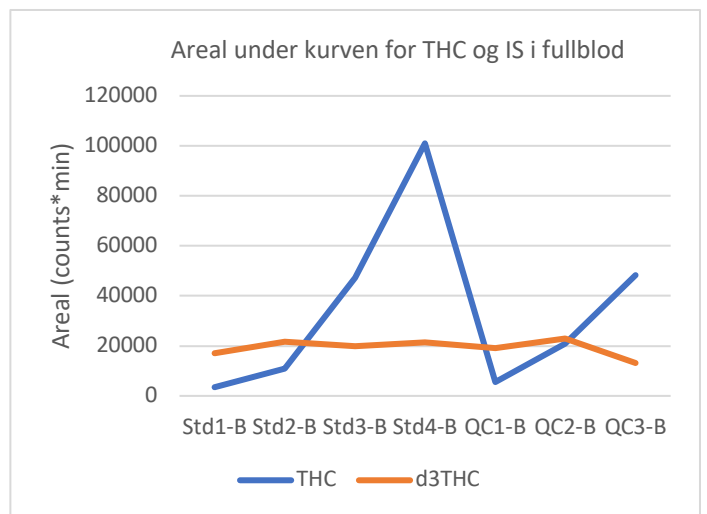
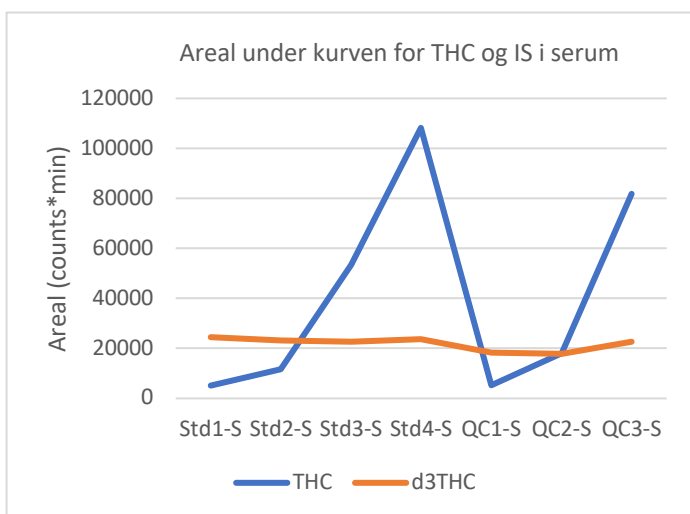
Figur 6.2.2: Dag 2 - Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og IS i serum og fullblod



Figur 6.2.3: Dag 3 - Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og IS i serum og fullblod



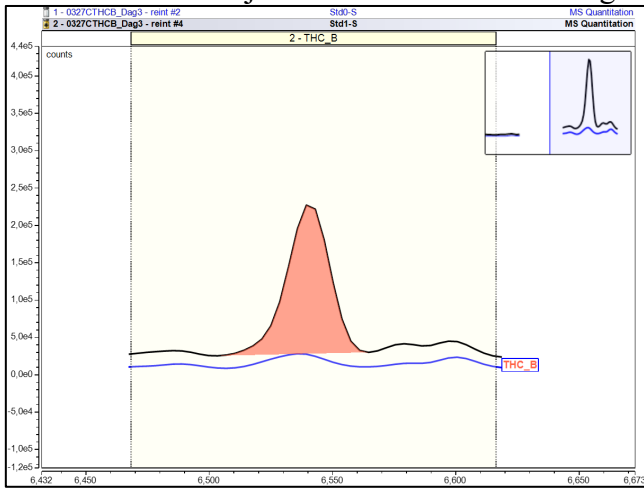
Figur 6.2.4: Dag 4 - Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og IS i serum og fullblod



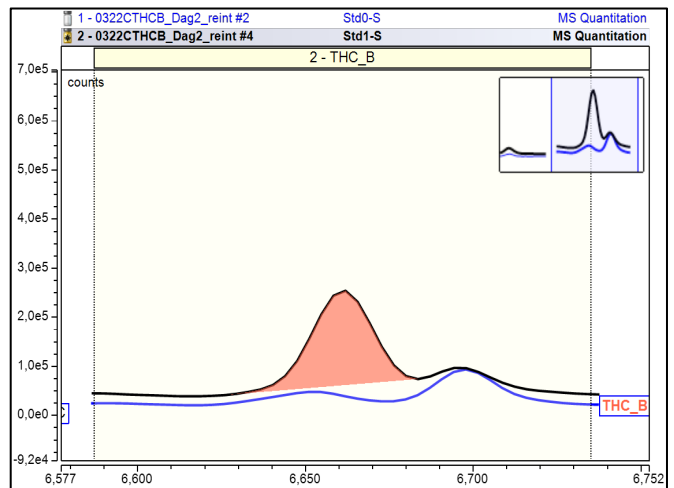
Figur 6.2.5: Dag 5 - Visuell fremstilling av arealet under kurven for THC og IS i serum og fullblod

**Vedlegg 3:** Kromatogram for standard 0 og standard 1 i serum fra dag 1-5, for undersøkelse av interfererende topper i serum.

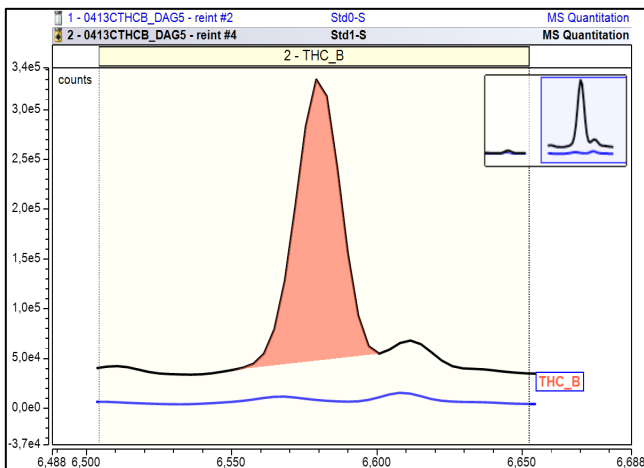
Den blå linjen viser standard 0, den svarte linjen viser standard 1. Avgrenset område er forventet retensjonstid for THC. Det rødfargede område under sort kurve er THC.



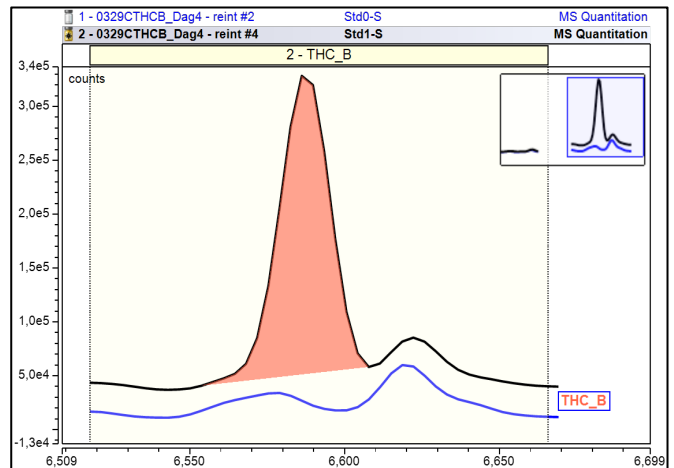
Figur 6.3.1: Kromatogram fra dag 1



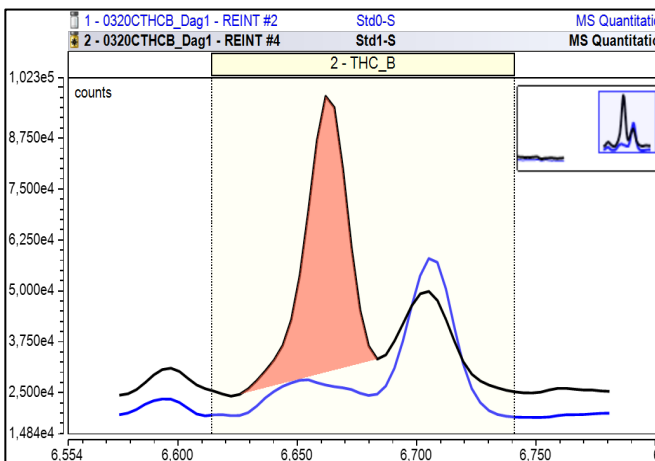
Figur 6.3.2: Kromatogram fra dag 2



Figur 6.3.3: kromatogram fra dag 3



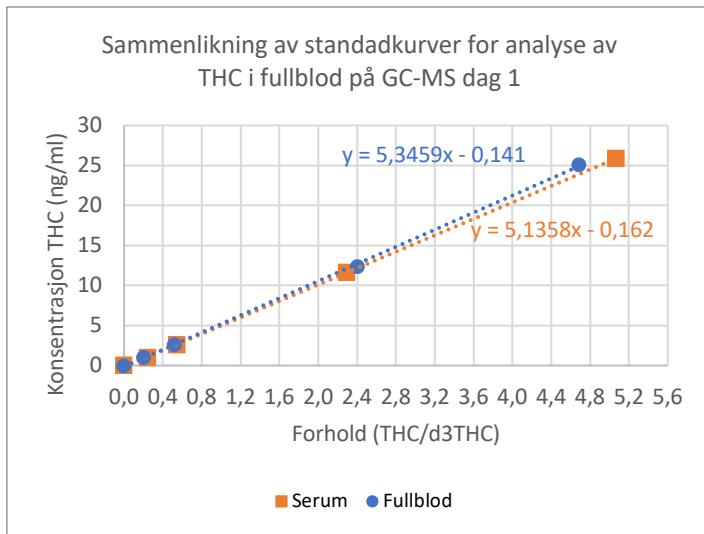
Figur 6.3.4: Kromatogram fra dag 4



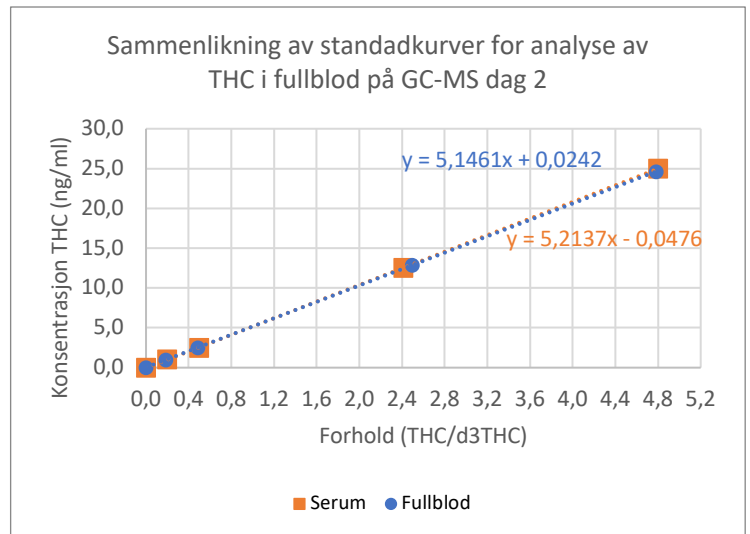
Figur 6.3.5: Kromatogram fra dag 5



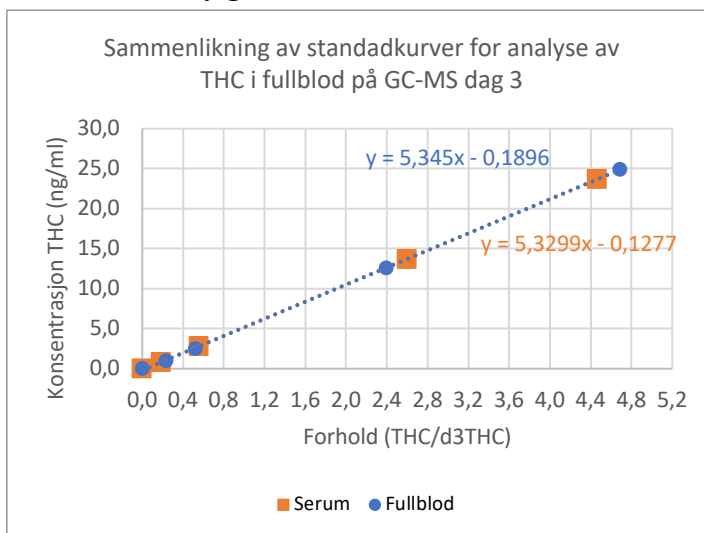
## Vedlegg 4: Sammenlikning av standardkurver laget med standarder i serum og i fullblod



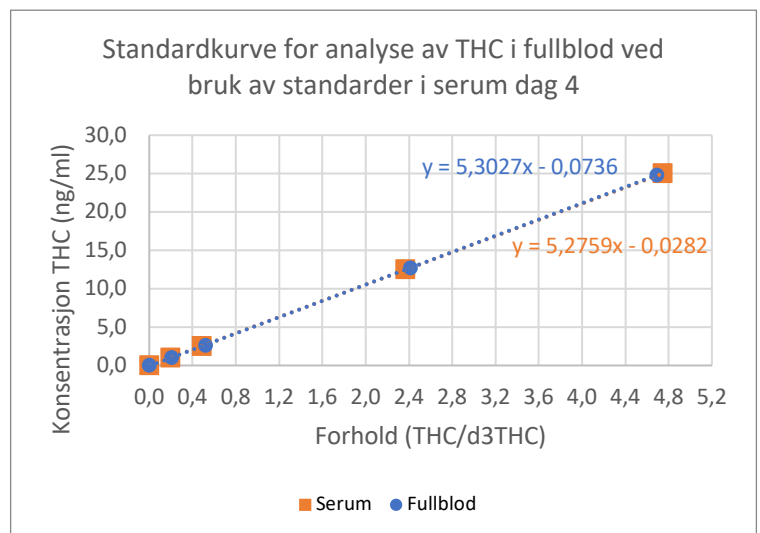
Figur 6.4.1: Sammenlikning av standardkurver dag 1. Denne tilsvarer figur 3.2.



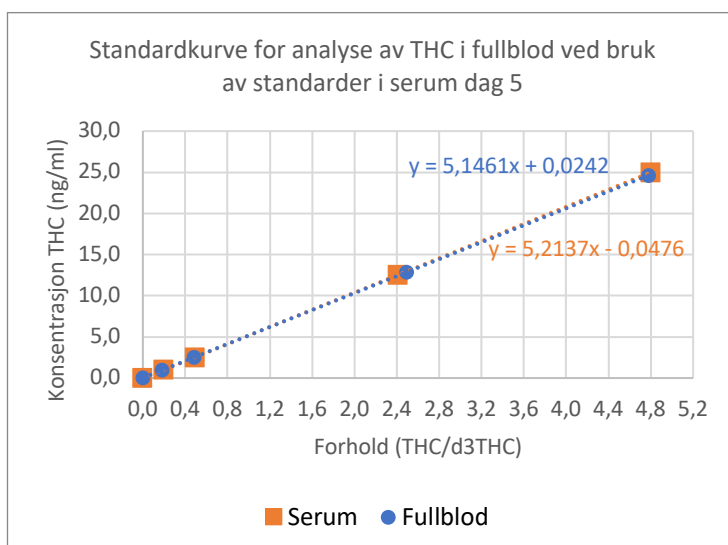
Figur 6.4.2: Sammenlikning av standardkurver dag 2



Figur 6.4.3: Sammenlikning av standardkurver dag 3



Figur 6.4.4: Sammenlikning av standardkurver dag 4



Figur 6.4.5: Sammenlikning av standardkurver dag 5

**Vedlegg 5:** Beregnet %avvik for prøver med ukjent konsentrasjon ved bruk av standardkurve i fullblod og serum.

*Tabell 6.5.1: Tabell for sammenlikning av THC konsentrasjon ved bruk av standardkurver i fullblod og standardkurve i serum.*

Dag	Prøve ID	Serumkurve (ng/mL)	Blodkurve (ng/mL)	Avvik (%)
1	1	1,8	1,6	12,5
1	2	4,0	3,7	8,1
1	3	29,7	27,9	6,5
1	4	20,2	18,9	6,9
1	5	27,7	26,0	6,5
1	6	7,1	6,6	7,6
1	7	3,3	3,1	6,5
1	8	1,8	1,7	5,9
2	9	2,1	2,0	5,0
2	10	2,0	1,9	5,3
2	11	22,4	22,6	-0,9
2	12	14,8	14,9	-0,7
2	13	3,4	3,3	3,0
2	14	5,0	5,0	0,0
2	15	1,3	1,3	0,0
2	16	2,7	2,6	3,8
3	17	10,5	10,6	-0,9
3	18	16,0	16,0	0,0
3	19	20,1	20,1	0,0
3	20	3,0	3,1	-3,2
3	21	3,3	3,3	0,0
3	22	2,5	2,6	-3,8
3	23	4,0	4,1	-2,4
3	24	1,9	2,0	-5,0
4	25	17,2	17,2	0,0
4	26	11,2	11,2	0,0
4	27	8,1	8,1	0,0
4	28	5,3	5,4	-1,9
4	29	13,0	13,0	0,0
4	30	6,5	6,5	0,0
4	31	9,0	9,0	0,0
4	32	4,2	4,3	-2,3
Gjennomsnittlig avvik				1,8

**Vedlegg 6: Rådata fra analysering, brukt til beregning av resultater.****Tabell 6.6.1: Rådata fra dag 1. Tabell A er beregnet med standard i serum og tabell B er beregnet med standard i fullblod.**

A	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	11800	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	5984	n.a.	n.a.
3	Std1-S	Standard	1	1,0	-1,7	6,66	6,65	1400	6242	64	64
4	Std1-FB	Standard	1	1,1	10,3	6,66	6,65	900	3656	33	33
5	Std2-S	Standard	2	2,6	2,2	6,66	6,65	3807	7447	140	144
6	Std2-FB	Standard	2	2,8	10,4	6,66	6,65	2291	4177	78	78
7	Std3-S	Standard	3	12,4	-0,8	6,66	6,64	12157	5267	815	383
8	Std3-FB	Standard	3	12,3	-1,3	6,66	6,65	7753	3377	426	302
9	Std4-S	Standard	4	25,1	0,2	6,66	6,64	16003	3466	1000	632
10	Std4-FB	Standard	4	27,5	10,2	6,66	6,65	12406	2447	409	346
11	QC1-S	Kontroll	5	1,5	-0,9	6,66	6,65	976	3085	46	46
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,7	12,2	6,66	6,65	748	2124	44	44
13	QC2-S	Kontroll	6	5,2	4,4	6,66	6,65	2439	2446	156	91
14	QC2-FB	Kontroll	6	5,0	-1,0	6,66	6,65	1767	1864	103	103
15	QC3-S	Kontroll	7	17,9	-10,6	6,66	6,65	9716	2939	442	273
16	QC3-FB	Kontroll	7	19,0	-5,0	6,66	6,65	6986	1990	609	439
17	P1	Ukjent		1,8	n.a.	6,66	6,65	673	1831	30	30
18	P2	Ukjent		4,0	n.a.	6,66	6,65	1996	2599	131	n.a.
19	P3	Ukjent		29,7	n.a.	6,66	6,65	16064	2940	1544	757
20	P4	Ukjent		20,2	n.a.	6,66	6,64	7835	2105	1458	466
21	P5	Ukjent		27,7	n.a.	6,66	6,65	10065	1977	547	346
22	P6	Ukjent		7,1	n.a.	6,66	6,65	1935	1451	153	n.a.
23	P7	Ukjent		3,3	n.a.	6,66	6,65	2726	4234	136	n.a.
24	P8	Ukjent		1,8	n.a.	6,66	6,65	772	2047	50	50

B	Injection Name	Type	Level	Amount	Amnt.Dev.	Ret.Time	Ret.Time	Area	Area	S/N	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	11800	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	5984	n.a.	n.a.
3	Std1-S	Standard		0,9	n.a.	6 662	6,65	1400	6242	64	64
4	Std1-FB	Standard	1	1	1,3	6 662	6,65	900	3656	33	33
5	Std2-S	Standard	2	2,4	-4,9	6 662	6,65	3807	7447	140	140
6	Std2-FB	Standard	2	2,6	2,8	6 662	6,65	2291	4177	78	78
7	Std3-S	Standard	3	11,6	-7	6 658	6,64	12157	5267	815	815
8	Std3-FB	Standard	3	11,6	-7,5	6 658	6,65	7753	3377	426	426
9	Std4-S	Standard	4	23,5	-5,9	6 658	6,64	16003	3466	1000	1000
10	Std4-FB	Standard	4	25,9	3,4	6 662	6,65	12406	2447	409	409
11	QC1-S	Kontroll	5	1,4	-8,4	6 662	6,65	976	3085	46	46
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,6	3,9	6 662	6,65	748	2124	44	44
13	QC2-S	Kontroll	6	4,9	-2,4	6 658	6,65	2439	2446	156	156
14	QC2-FB	Kontroll	6	4,6	-7,5	6 658	6,65	1767	1864	103	103
15	QC3S	Kontroll	7	16,8	-16,2	6 662	6,65	9716	2939	442	442
16	QC3-FB	Kontroll	7	17,8	-10,9	6 658	6,65	6986	1990	609	609
17	P1	Ukjent		1,6	n.a.	6 662	6,65	673	1831	30	30
18	P2	Ukjent		3,7	n.a.	6 662	6,65	1996	2599	131	131
19	P3	Ukjent		27,9	n.a.	6 662	6,65	16064	2940	1544	1544
20	P4	Ukjent		18,9	n.a.	6 658	6,64	7835	2105	1458	1458
21	P5	Ukjent		26	n.a.	6 658	6,65	10065	1977	547	547
22	P6	Ukjent		6,6	n.a.	6 662	6,65	1935	1451	153	153
23	P7	Ukjent		3,1	n.a.	6 662	6,65	2726	4234	136	136
24	P8	Ukjent		1,7	n.a.	6 662	6,65	772	2047	50	50

Tabell 6.6.2: Rådata fra dag 2. Tabell A er beregnet med standard i serum og tabell B er beregnet med standard i fullblod.

A	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N	S/N
No.				ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantiteringsion	Kvalifiseringion
				THC	THC	THC	d3THC	THC	d3THC	THC	THC
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	11368	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	18506	n.a.	n.a.
3	Std1-S	standard	1	1,0	-2,1	6,66	6,65	4090	21972	279	159
4	Std1-FB	standard	1	1,0	4,3	6,66	6,65	3089	15557	121	208
5	Std2-S	standard	2	2,5	0,7	6,66	6,65	8445	17419	539	539
6	Std2-FB	standard	2	2,6	3,2	6,66	6,65	9040	18182	502	502
7	Std3-S	standard	3	12,9	2,9	6,66	6,65	45016	18063	1411	3306
8	Std3-FB	standard	3	12,5	-0,3	6,66	6,65	32434	13435	3174	1885
9	Std4-S	standard	4	24,6	-1,4	6,66	6,65	106988	22380	6385	3267
10	Std4-FB	standard	4	24,7	-1,0	6,66	6,65	98234	20467	4619	3733
11	QC1-S	kontroll	5	1,5	1,1	6,66	6,65	5212	17930	363	363
12	QC1-FB	kontroll	5	1,4	-6,2	6,66	6,65	3656	13571	31	31
13	QC2-S	kontroll	6	5,0	0,8	6,66	6,65	14590	14973	398	398
14	QC2-FB	kontroll	6	4,8	-3,5	6,66	6,65	10801	11574	207	207
15	QC3-S	kontroll	7	19,2	-4,0	6,66	6,65	66850	17959	6496	1889
16	QC3-FB	kontroll	7	19,0	-4,8	6,66	6,65	38842	10521	1277	1258
17	P9	ukjent		2,1	n.a.	6,66	6,65	4763	12056	106	106
18	P10	ukjent		2,0	n.a.	6,67	6,65	5540	14566	159	159
19	P11	ukjent		22,4	n.a.	6,66	6,65	62462	14376	1829	3660
20	P12	ukjent		14,8	n.a.	6,66	6,65	30630	10701	1373	798
21	P13	ukjent		3,4	n.a.	6,66	6,65	6579	10093	209	414
22	P14	ukjent		5,0	n.a.	6,66	6,65	9424	9681	345	458
23	P15	ukjent		1,3	n.a.	6,66	6,65	1604	6212	103	103
24	P16	ukjent		2,7	n.a.	6,66	6,65	7657	14776	284	284

B	Injection Name	Type	nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N
No.				ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	kvantiteringsion
				THC	THC	THC	d3THC	THC	d3THC	THC
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	11368	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,65	n.a.	18506	n.a.
3	Std1-S	standard	1	0,9	-8,1	6,66	6,65	4090	21972	279
4	Std1-FB	standard	1	1,0	-1,6	6,66	6,65	3089	15557	121
5	Std2-S	standard	2	2,5	-1	6,66	6,65	8445	17419	539
6	Std2-FB	standard	2	2,5	1,6	6,66	6,65	9040	18182	502
7	Std3-S	standard	3	12,9	3,5	6,66	6,65	45016	18063	1411
8	Std3-FB	standard	3	12,5	0,2	6,66	6,65	32434	13435	3174
9	Std4-S	standard	4	24,9	-0,6	6,66	6,65	106988	22380	6385
10	Std4-FB	standard	4	25,0	-0,2	6,66	6,65	98234	20467	4619
11	QC1-S	kontroll	5	1,5	-2,4	6,66	6,65	5212	17930	363
12	QC1-FB	kontroll	5	1,4	-9,8	6,66	6,65	3656	13571	31
13	QC2-S	kontroll	6	5,0	0,5	6,66	6,65	14590	14973	398
14	QC2-FB	kontroll	6	4,8	-3,8	6,66	6,65	10801	11574	207
15	QC3-S	kontroll	7	19,3	-3,3	6,66	6,65	66850	17959	6496
16	QC3-FB	kontroll	7	19,2	-4,1	6,66	6,65	38842	10521	1277
17	P9	ukjent		23,0	n.a.	6,66	6,65	4763	12056	106
18	P10	ukjent		1,9	n.a.	6,67	6,65	5540	14566	159
19	P11	ukjent		22,6	n.a.	6,66	6,65	62462	14376	1829
20	P12	ukjent		14,9	n.a.	6,66	6,65	30630	10701	1373
21	P13	ukjent		3,3	n.a.	6,66	6,65	6579	10093	209
22	P14	ukjent		5,0	n.a.	6,66	6,65	9424	9681	345
23	P15	ukjent		1,3	n.a.	6,66	6,65	1604	6212	103
24	P16	ukjent		2,6	n.a.	6,66	6,65	7657	14776	284

Tabell 6.6.3: Rådata fra dag 3. Tabell A er beregnet med standard i serum og tabell B er beregnet med standard i fullblod.

A	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantiteringsion	Kvalifiseringsion
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,5	n.a.	16023	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,5	n.a.	20957	n.a.	n.a.
3	Std1-S	Standard	1	1,0	-1,7	6,5	6,5	4108	17356	60	188
4	Std1-FB	Standard	1	0,9	-5,1	6,5	6,5	3049	13233	116	632
5	Std2-S	Standard	2	2,5	1,5	6,5	6,5	8152	15499	189	737
6	Std2-FB	Standard	2	2,7	8,3	6,5	6,5	9106	16326	167	1250
7	Std3-S	Standard	3	12,6	0,7	6,5	6,5	46501	19403	1120	4086
8	Std3-FB	Standard	3	13,7	9,3	6,5	6,5	42863	16495	796	10924
9	Std4-S	Standard	4	24,9	-0,4	6,5	6,5	96041	20483	3463	11533
10	Std4-FB	Standard	4	23,7	-5,2	6,5	6,5	42690	9558	760	4919
11	QC1-S	Kontroll	5	1,4	-6,1	6,5	6,5	4614	14599	74	842
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,4	-7,3	6,6	6,5	4974	15920	153	914
13	QC2-S	Kontroll	6	5,2	4,5	6,5	6,5	13927	13571	543	1700
14	QC2-FB	Kontroll	6	5,0	-1,0	6,5	6,5	14929	15303	368	2406
15	QC3-S	Kontroll	7	19,6	-2,0	6,5	6,5	63853	17238	1443	8605
16	QC3-FB	Kontroll	7	19,8	-1,1	6,5	6,5	54926	14699	1291	7357
17	P17	Ukjent		10,5	n.a.	6,5	6,5	14179	7047	612	4823
18	P18	Ukjent		16,0	n.a.	6,5	6,5	36218	11941	1910	4103
19	P19	Ukjent		20,1	n.a.	6,5	6,5	19823	5228	5012	6900
20	P20	Ukjent		3,0	n.a.	6,5	6,5	4857	8004	241	1094
21	P21	Ukjent		3,3	n.a.	6,6	6,5	5622	8523	482	1242
22	P22	Ukjent		2,5	n.a.	6,5	6,5	4462	8520	126	126
23	P23	Ukjent		4,0	n.a.	6,6	6,5	6737	8431	690	1020
24	P24	Ukjent		1,9	n.a.	6,6	6,5	2933	7304	168	168

B	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,5	n.a.	16023	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,5	n.a.	20957	n.a.
3	Std1-S	Standard	1	1,1	8,9	6,5	6,5	4108	17356	60
4	Std1-FB	Standard	1	0,8	-16,3	6,5	6,5	2508	13233	632
5	Std2-S	Standard	2	2,6	5,3	6,5	6,5	8152	15499	189
6	Std2-FB	Standard	2	2,8	12,1	6,5	6,5	9106	16326	167
7	Std3-S	Standard	3	12,6	0,9	6,5	6,5	46501	19403	1120
8	Std3-FB	Standard	3	13,7	9,6	6,5	6,5	42863	16495	796
9	Std4-S	Standard	4	24,9	-0,6	6,5	6,5	96041	20483	3463
10	Std4-FB	Standard	4	23,7	-5,3	6,5	6,5	42690	9558	760
11	QC1-S	Kontroll	5	1,5	0,8	6,5	6,5	4614	14599	74
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,5	-0,5	6,6	6,5	4974	15920	153
13	QC2-S	Kontroll	6	5,3	6,1	6,5	6,5	13927	13571	543
14	QC2-FB	Kontroll	6	5,0	0,7	6,5	6,5	14929	15303	368
15	QC3-S	Kontroll	7	19,6	-2,0	6,5	6,5	63853	17238	1443
16	QC3-FB	Kontroll	7	19,8	-1,1	6,5	6,5	54926	14699	1291
17	P17	Ukjent		10,6	n.a.	6,5	6,5	14179	7047	612
18	P18	Ukjent		16,0	n.a.	6,5	6,5	36218	11941	1910
19	P19	Ukjent		20,1	n.a.	6,5	6,5	19823	5228	5012
20	P20	Ukjent		3,1	n.a.	6,5	6,5	4857	8004	241
21	P21	Ukjent		3,3	n.a.	6,6	6,5	5622	8523	482
22	P22	Ukjent		2,6	n.a.	6,5	6,5	4462	8520	126
23	P23	Ukjent		4,1	n.a.	6,6	6,5	6737	8431	690
24	P24	Ukjent		2,0	n.a.	6,6	6,5	2933	7304	168



Tabell 6.6.5: Rådata fra dag 5. Tabell A er beregnet med standard i serum og tabell B er beregnet med standard i fullblod.

A	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,56	n.a.	8387	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,56	n.a.	14586	n.a.	n.a.
3	Std1-S	Standard	1	1,0	-2,9	6,58	6,57	5137	24499	257	257
4	Std1-FB	Standard	1	0,9	-6	6,58	6,57	3471	17003	238	238
5	Std2-S	Standard	2	2,6	2,2	6,58	6,57	11575	23106	619	789
6	Std2-FB	Standard	2	2,6	3,4	6,58	6,57	11033	21794	608	652
7	Std3-S	Standard	3	12,7	1,7	6,58	6,57	53490	22603	3928	4157
8	Std3-FB	Standard	3	12,9	2,9	6,58	6,57	47292	19747	2417	2597
9	Std4-S	Standard	4	24,8	-0,9	6,58	6,57	108225	23615	4149	4018
10	Std4-FB	Standard	4	25,5	1,9	6,58	6,57	101012	21427	4554	4250
11	QC1-S	Kontroll	5	1,4	-5,6	6,58	6,57	5367	18410	532	633
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,4	-7,2	6,58	6,56	5495	19131	230	230
13	QC2-S	Kontroll	6	5,3	6,6	6,58	6,57	18027	17835	771	720
14	QC2-FB	Kontroll	6	4,8	-4	6,58	6,57	20973	22950	1006	992
15	QC3-S	Kontroll	7	19,5	-2,5	6,58	6,57	81882	22658	4122	3539
16	QC3-FB	Kontroll	7	19,8	-0,8	6,58	6,56	48380	13155	3087	2386
17	QC1.1-FB	Kontroll	5	1,4	-4,5	6,58	6,57	5028	17073	327	327
18	QC1.2-FB	Kontroll	5	1,4	-7,6	6,58	6,57	4755	16618	188	161
19	QC1.3-FB	Kontroll	5	1,4	-5,7	6,58	6,57	4995	17155	252	159
20	QC3.1-FB	Kontroll	7	18,8	-6	6,58	6,56	67039	19226	2931	1744
21	QC3.2-FB	Kontroll	7	20	0,1	6,58	6,57	72636	19577	2640	1941
22	QC3.3-FB	Kontroll	7	19,3	-3,5	6,58	6,57	97415	27212	2634	2556

B	Injection Name	Type	Nivå	Amount	Amnt.Dev.	RT	RT	Area	Area	S/N	S/N
No.	Selected Peak:			ng/ml	%	min	min	counts*min	counts*min	Kvantifiseringsion	Kvalifiseringsion
				THC B	THC B	THC B	d3THC	THC B	d3THC	THC B	THC B
1	Std0-S	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,56	n.a.	8387	n.a.	n.a.
2	Std0-FB	Blank		n.a.	n.a.	n.a.	6,56	n.a.	14586	n.a.	n.a.
3	Std1-S	Standard	1	1,0	-0,1	6,58	6,57	5137	24499	257	257
4	Std1-FB	Standard	1	1,0	-3	6,58	6,57	3471	17003	238	238
5	Std2-S	Standard	2	2,5	1,7	6,58	6,57	11575	23106	619	789
6	Std2-FB	Standard	2	2,6	2,9	6,58	6,57	11033	21794	608	652
7	Std3-S	Standard	3	12,4	-0,5	6,58	6,57	53490	22603	3928	4157
8	Std3-FB	Standard	3	12,6	0,7	6,58	6,57	47292	19747	2417	2597
9	Std4-S	Standard	4	24,2	-3,3	6,58	6,57	108225	23615	4149	4018
10	Std4-FB	Standard	4	24,9	-0,5	6,58	6,57	101012	21427	4554	4250
11	QC1-S	Kontroll	5	1,4	-4,5	6,58	6,57	5367	18410	532	633
12	QC1-FB	Kontroll	5	1,4	-6	6,58	6,56	5495	19131	230	230
13	QC2-S	Kontroll	6	5,2	4,9	6,58	6,57	18027	17835	771	720
14	QC2-FB	Kontroll	6	4,7	-5,4	6,58	6,57	20973	22950	1006	992
15	QC3-S	Kontroll	7	19	-4,8	6,58	6,57	81882	22658	4122	3539
16	QC3-FB	Kontroll	7	19,4	-3,1	6,58	6,56	48380	13155	3087	2386
17	QC1.1-FB	Kontroll	5	1,4	-3,4	6,58	6,57	5028	17073	327	327
18	QC1.2-FB	Kontroll	5	1,4	-6,4	6,58	6,57	4755	16618	188	161
19	QC1.3-FB	Kontroll	5	1,4	-4,6	6,58	6,57	4995	17155	252	159
20	QC3.1-FB	Kontroll	7	18,4	-8,1	6,58	6,56	67039	19226	2931	1744
21	QC3.2-FB	Kontroll	7	19,6	-2,2	6,58	6,57	72636	19577	2640	1941
22	QC3.3-FB	Kontroll	7	18,9	-5,7	6,58	6,57	97415	27212	2634	2556

**Vedlegg 7: Data benyttet til å lage Bland-Altman plott**

Tabell 6.7.1: Data benyttet til å lage Bland-Altman plott

Dag	Prøvetype	Resultater m/ blodkurve	Resultater m/ serumkurve	Differanse	% avvik
1	QC 1 s	1,4	1,5	0,1	7,1
1	QC 1 fb	1,6	1,7	0,1	6,2
1	QC 2 s	4,9	5,2	0,3	6,1
1	QC 2 fb	4,6	5,0	0,4	8,7
1	QC 3 s	16,8	17,9	1,1	6,5
1	QC 3 fb	17,8	19,0	1,2	6,7
1	1	1,6	1,8	0,2	12,5
1	2	3,7	4,0	0,3	8,1
1	3	27,9	29,7	1,8	6,5
1	4	18,9	20,2	1,3	6,9
1	5	26,0	27,7	1,7	6,5
1	6	6,6	7,1	0,5	7,6
1	7	3,1	3,3	0,2	6,5
1	8	1,7	1,8	0,1	5,9
2	QC 1 s	1,5	1,5	0,0	0,0
2	QC 1 fb	1,4	1,4	0,0	0,0
2	QC 2 s	5,0	5,0	0,0	0,0
2	QC 2 fb	4,8	4,8	0,0	0,0
2	QC 3 s	19,3	19,2	-0,1	-0,5
2	QC 3 fb	19,2	19,0	-0,2	-1,0
2	9	2,0	2,1	0,1	5,0
2	10	1,9	2,0	0,1	5,3
2	11	22,6	22,4	-0,2	-0,9
2	12	14,9	14,8	-0,1	-0,7
2	13	3,3	3,4	0,1	3,0
2	14	5,0	5,0	0,0	0,0
2	15	1,3	1,3	0,0	0,0
2	16	2,6	2,7	0,1	3,8
3	QC 1 s	1,5	1,4	-0,1	-6,7
3	QC 1 fb	1,5	1,4	-0,1	-6,7
3	QC 2 s	5,3	5,2	-0,1	-1,9
3	QC 2 fb	5,0	5,0	0,0	0,0
3	QC 3 s	19,6	19,6	0,0	0,0
3	QC 3 fb	19,8	19,8	0,0	0,0
3	17	10,6	10,5	-0,1	-0,9
3	18	16,0	16,0	0,0	0,0
3	19	20,1	20,1	0,0	0,0
3	20	3,1	3,0	-0,1	-3,2
3	21	3,3	3,3	0,0	0,0
3	22	2,6	2,5	-0,1	-3,8
3	23	4,1	4,0	-0,1	-2,4
3	24	2,0	1,9	-0,1	-5,0
4	QC 1 s	1,5	1,4	-0,1	-6,7
4	QC 1 fb	1,5	1,4	-0,1	-6,7
4	QC 2 s	5,5	5,5	0,0	0,0
4	QC 2 fb	5,2	5,2	0,0	0,0
4	QC 3 s	19,5	19,5	0,0	0,0
4	QC 3 fb	19,4	19,4	0,0	0,0



4	25	17,2	17,2	0,0	0,0
4	26	11,2	11,2	0,0	0,0
4	27	8,1	8,1	0,0	0,0
4	28	5,4	5,3	-0,1	-1,9
4	29	13,0	13,0	0,0	0,0
4	30	6,5	6,5	0,0	0,0
4	31	9,0	9,0	0,0	0,0
4	32	4,3	4,2	-0,1	-2,3
5	QC 1 s	1,4	1,4	0,0	0,0
5	QC 1 fb	1,4	1,4	0,0	0,0
5	QC 2 s	5,2	5,3	0,1	1,9
5	QC 2 fb	4,7	4,8	0,1	2,1
5	QC 3 s	19,0	19,5	0,5	2,6
5	QC 3 fb	19,4	19,8	0,4	2,1
<b>gj.snittlig avvik</b>				<b>0,14516129</b>	<b>1,233</b>
<b>SD</b>				<b>0,41594349</b>	<b>4,110</b>
<b>Nedre grense</b>				<b>-0,67008796</b>	<b>-6,822</b>
<b>Øvre grense</b>				<b>0,96041054</b>	<b>9,289</b>

