


Forord

Denne bacheloroppgaven ble skrevet som avsluttende oppgave på bioingeniørutdanningen ved Norges teknisk- naturvitenskaplige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven ble gitt av Avdeling klinisk farmakologi ved St. Olavs Hospital, Trondheim.


Vi vil i den forbindelse utrette en stor takk til prosessveileder førstelektor Margareth Nupen ved NTNU og faglige veiledere kjemiker Marija Tomic, bioingeniør Sarita Hammes og spesialbioingeniør Maja Loevenich ved Avdeling klinisk farmakologi, for god faglig veiledning og innspill under hele prosessen samt berømme de for all tid de har brukt. Vi vil også takke hele avdelingen for å ha tatt oss godt imot og ha lagt til rette for oss. I tillegg vil vi takke Per Mogens for gode råd.



Tor Eivind S. Iversen



Yafiet K. Andemeskel



Nils Gustav B. Kappfjell

Sammendrag

Validering av metode for kvantifisering av amfetaminer (amfetamin, metamfetamin, 2,3-metylendioksyamfetamin (MDA) og 2,3-metylendioksymetamfetamin (MDMA)) og ritalinsyre i serum ved bruk av ny detektor, Xevo TQ-XS, på en Ultra Performance Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometre (UPLC-MS/MS) har blitt gjennomført. Xevo TQ-XS har sammenlignet med eldre detektor, Xevo TQ-S, en høyere sensitivitet da den fragmenterer færre ioner og flere ioner når dermed spenningsmåleren.

Forenklet validering ble utført ved å teste metodens linearitet, nedre kvantifiseringsgrense, reproduserbarhet, nøyaktighet, matrikseffekter, robusthet og internstandard-recovery. I tillegg ble det gjennomført en direkte sammenligning mellom detektorene ved å teste samsvar mellom instrumentene. Målingene fra Xevo TQ-XS ble vurdert ut fra valideringskrav satt av laboratoriets forskning og utviklings-seksjon, etter internasjonale standarder.

Forsøkene viste at med ny detektor, holder metoden høy grad av linearitet ($R > 0,9998$) innenfor analyttenes måleområder, og nedre deteksjonsgrense kan beholdes med signal/noise-ratioer godt innenfor kravene. Dessuten ser man at både nøyaktigheten og reproduserbarheten for metoden innfrir alle krav. Med internstandard-korrigerings, er det tilnærmet ingen matrikseffekter og robustheten tilfredsstillende alle krav for forskyvning av areal innad i analyseseriene. Man ser også variasjon av internstandard-areal som ligger godt innenfor det som er definert som akseptable avvik etablert med tidligere detektor. I tillegg viser den direkte sammenligningen mellom instrumentene, ved bruk av regresjonsplot, at det er ingen tegn til systemiske avvik mellom detektorene når det gjelder nøyaktighet.

Enkelt valideringsforsøk har vist at detektoren Xevo TQ-XS er klar til kvantifisering av amfetaminer og ritalinsyre i serum på UPLC-MS/MS

Abstract

Validation of methods for quantification of amphetamines (amphetamine, methamphetamine, 2,3-methylenedioxyamphetamine (MDA) and 2,3-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)) and ritalinic acid in serum using a new detector, Xevo TQ-XS, on an Ultra Performance Liquid Chromatograph Tandem Mass Spectrometer (UPLC-MS/MS) has been carried out. Compared to the previous detector, Xevo TQ-S, the new Xevo TQ-XS is more sensitive as fewer ions are fragmented thus more of them reach the voltage meter.

A Simplified validation was performed to test the methods linearity, lower limit of quantification, reproducibility, accuracy, matrix effects, robustness and internal standard recovery. In addition, a direct comparison was made between the detectors by testing the comparability between the instruments. The measurements from Xevo TQ-XS were verified based on validation requirements set by the laboratory's Science and Development-section, using international standards.

The results show linearity ($R > 0.9998$) in the concentration ranges for all analytes and the lower limit of quantification may be kept as the signal/noise-ratio is well within the requirements. Furthermore, the results have shown that both accuracy and reproducibility for the method meets all requirements. When adjusted for with internal standards, the matrix effects are as good as non-existing, and the method's robustness satisfies the requirements for shift of internal standard-area within a single analysis series. The results also show that the variation of internal standard-area is within acceptable deviations, established with the older detector. In addition, the direct comparison between the instruments, using regression analysis shows that there are no signs of systematic deviation between the instruments in terms of accuracy.

The study has shown that the detector, Xevo TQ-XS, can be used for quantitative analysis of amphetamines and ritalinic acid in serum on UPLC-MS/MS.

Innholdsfortegnelse

1. INNLEDNING	1
1.1 Prøveopparbeidelse	1
1.2 Omvendtfase-væskekromatografi	2
1.3 Deteksjon ved massespektrometri	5
1.4 Kromatogramtolkning	7
1.5 Internstandard	9
1.6 Valideringskriterier	10
1.6.1 Kvantifiseringsgrense	10
1.6.2 Reproduserbarhet og nøyaktighet	11
1.6.3 Matrikseffekt	11
1.6.4 Robusthet	12
1.6.5 Internstandard-recovery	12
1.7 Problemstillinger	13
2. MATERIALE OG METODE	14
2.1 Prøvemateriale	14
2.2 Reagenser og utstyr	15
2.3 Prøveopparbeidelse	16
2.4 UPLC-MS/MS instrumentinnstillinger	16
2.5 Databehandling	17
2.6 Valideringsparametere	18
3. RESULTATER OG DISKUSJONER	20
3.1 Standardkurve – kurvetilpassing og måleområde	20
3.2 Kvantifiseringsgrense	21
3.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet	22
3.4 Matrikseffekt	23
3.5 Robusthet	24
3.6 Internstandard–recovery	25
3.7 Instrumentsammenligning	27
4. KONLUSJONER	29
REFERANSER	30
VEDLEGG	32

Forkortelsesliste

NTNU – Norges Teknisk-Naturvitenskaplige Universitet

UPLC-MS/MS – Ultra performance liquid chromatograph tandem mass spectrometre

IS – Internstandard

MDA – 3,4-metylendioksyamfetamin

MDMA – 3,4-metylendioksymetamfetamin

GC – Gasskromatografi

m/z-ratio – Masse/ladning-ratio

S/N – Signal/Noise

QC – Kvalitetskontroll

Std – Standard

CV – Variasjonskoeffisient

SD – Standardavvik

SLP – Sammenlignbare laboratorieprøver

ME – Matrikseffekt

1. INNLEDNING

Kromatografiske metoder brukes for å indentifisere og kvantifisere legemidler i biologiske materialer som spytt, urin, serum og blod. Instrumentet som benyttes til analyser av legemidler er Ultra Performance Liquid Chromatograph - Tandem massespektrometri (UPLC-MS/MS). For å øke analysens sensitivitet skal detektoren på UPLC MS/MS (Xevo TQ-S) erstattes med detektoren (Xevo TQ-XS). Forskjellen på de to detektorene er en geometrisk endring av ionekanalene, som fører til at den nye detektoren Xevo TQ-XS ikke fragmenterer ønskede ioner i like stor grad og er dermed mer sensitiv. [12]

Før instrumentet med detektoren Xevo TQ-XS kan tas i bruk, skal det undersøkes om det er samsvar mellom instrumentene med detektorene Xevo TQ-S og Xevo TQ-XS. For å avgjøre dette skal det undersøkes om dagens metode for analyse av amfetamin, metamfetamin, 3,4-metylendioksyamfetamin (MDA), 3,4-metylendioksymetamfetamin (MDMA) og ritalinsyre i serum, samsvarer mellom de to UPLC-MS/MS instrumentene med detektorene Xevo TQ-S og Xevo TQ-XS.

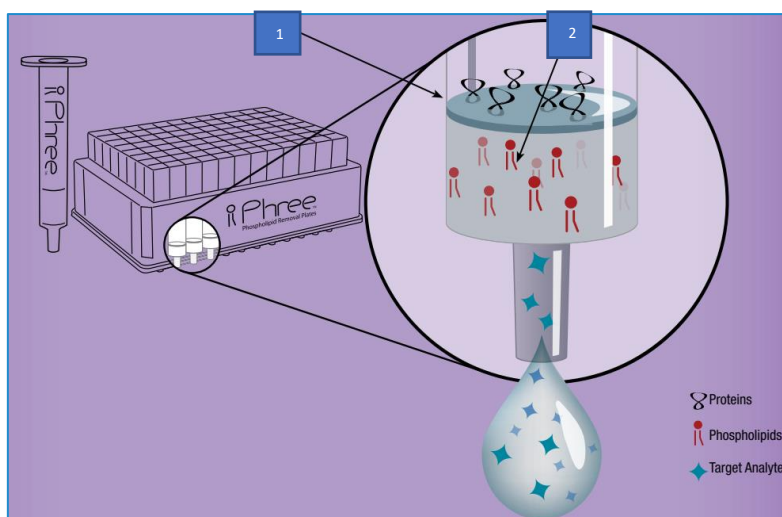
Undersøkelsen gjøres med fokus på linearitet, kvantifiseringsgrense, reproduserbarhet, nøyaktighet, matrikseffekter, robusthet og IS-recovery.

1.1 Prøveopparbeidelse

Prøveopparbeidelse er nødvendig fordi det biologiske prøvematerialet inneholder forbindelser som salter, proteiner, syrer, etc., som forurensrer analyseinstrumentene og reduserer den masse-spektrometriske responsen, altså ioneundertrykking.

Ved metoden for bestemmelse av amfetaminer og ritalinsyre i serum, benyttes proteinutfelling og fosfolipidfjerning. Årsaken til at proteinutfelling velges fremfor andre ekstraksjonsmetoder som væske-væske-ekstraksjon, er fordi prøvematerialet er svært proteinrikt og valgt metode er både mer kostnadseffektiv og tidsbesparende enn andre ekstraksjonsmetoder. Ved bruk av 96-brønns fosfolipidfjerningsplate (Ostroplate) vil både proteiner og fosfolipider i prøven fjernes i ett trinn.

Proteinutfellingen skjer ved at det tilsettes et organisk løsemiddel til prøven. Når det organiske løsemiddelet er tilsatt, vil det føre til denaturering av proteinet ved at det bindes salter og metaller til funksjonsgruppene slik at de intramolekylære kreftene blir hindret. De denaturerte proteinene vil binde seg til hverandre og danne agglutiner. Agglutinatene og fosfolipidene som er løst i organisk løsemiddelet holdes igjen av filteret, slik at kun analyttene slippes gjennom, som vist i figur 1.1.[11]



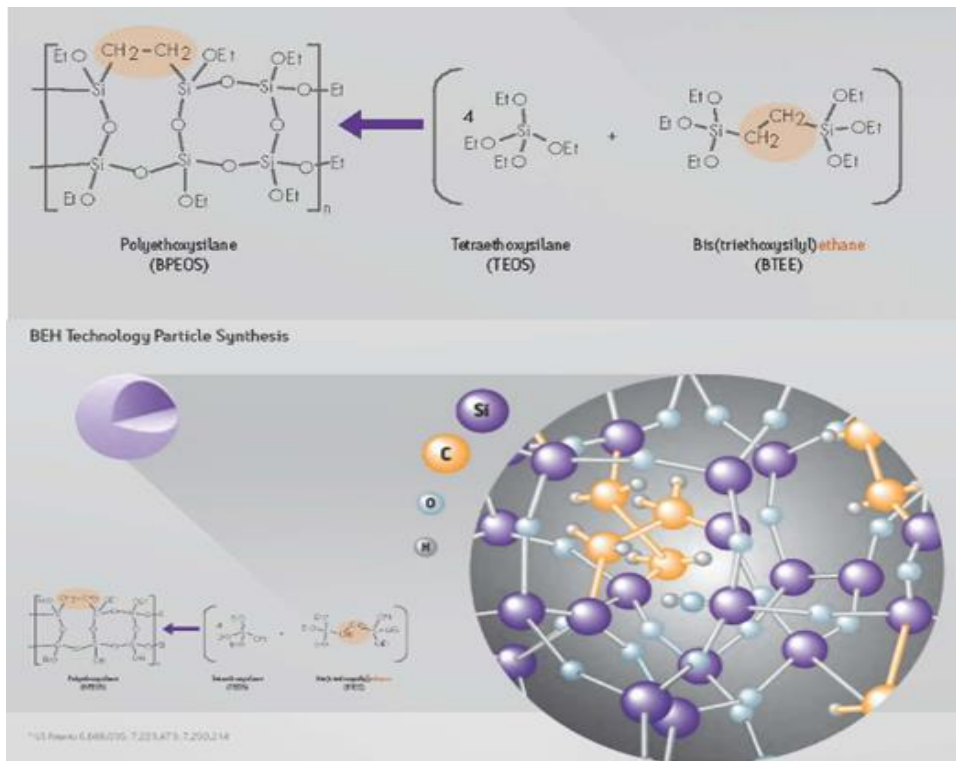
Figur 1.1: Prinsippet for fjerning av proteiner og fosfolipider. Proteinene vil løse seg i hydrofildelen (1) og danne agglutinator, mens fosfolipidene vil løse seg i det hydrofobe laget (2). Når brønnen tilsettes positiv trykk, vil proteinene og fosfolipidene holdes igjen av filteret, mens amfetaminer og ritalinsyre slippes gjennom. [3]

1.2 Omvendtfase-væskekromatografi

Omvendtfase-kromatografi er et separasjonsprinsipp som benyttes ved væskekromatografiske metoder der mobilfasen er mer polar enn stasjonærfasen.^[15] Ved omvendtfase-kromatografi vil polariteten til en forbindelse bestemme hvor lang tid forbindelsen bruker gjennom analyseinstrumentet. Forbindelser som er mest polar vil bruke kortest tid gjennom instrumentet, mens upolare forbindelser vil holdes igjen av hydrofobe krefter fra stasjonærfasen og dermed få lengere retensjonstid. [10]

Ved metoder for kvantitativ bestemmelse av lege- og rusmidler benyttes det oftest omvendtfase-kromatografi over gasskromatografi (GC). Årsaken til dette er at de fleste lege- eller rusmidlene er polare og lite flyktige og dermed vanskelig å få over i gassform. Derfor er det ikke like gunstig å benytte GC. [16] Omvendtfase-væskekromatografi foretrekkes over andre væskekromatografiske metoder fordi det benyttes mindre miljøskadelige organiske løsemidler.

Stasjonærfasen som benyttes ved omvendtfase-kromatografi, er hydrokarbonkjeder bundet til innsiden av en kolonne ved hjelp av silica-partikler.^[14] Denne upolare kolonnen retarderer analytter ved hjelp av hydrofobe interaksjoner og dermed vil disse kreftene være størst når analyttene er mer upolar.[10]

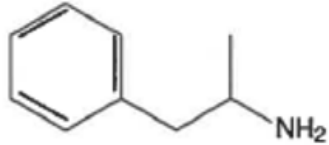
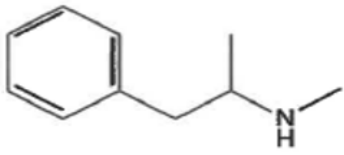
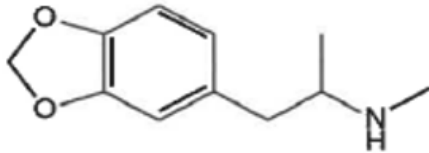
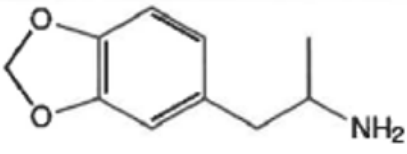
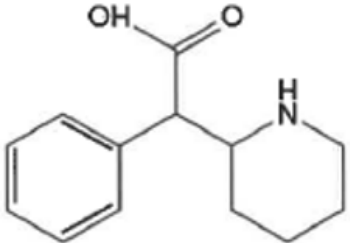


Figur 1.2: Figuren viser oppbygningen av stasjonærfasen. Hydrokarbonkjedene (oransje) er bundet silica-atomene (lilla) som binder seg til innsiden av kolonnen. Analytter som strømmer gjennom mellomrommet, vil kun påvirkes av hydrofobe krefter fra hydrokarbonkjedene.[6]

Polariteten til mobilfasen vil også påvirke interaksjoner mellom analytten og stasjonærfasen, slik at man kan endre sammensetningen av mobilfasen for å best mulig separasjon. Ved bestemmelse av amfetaminer og ritalinsyre vil det være vanskelig å få bra separasjon på bakgrunn av analyttens lignende kjemiske strukturer og egenskaper. For å optimalisere separasjonen mellom analyttene uten at analysetiden blir for lang, benyttes det en mobilfasegradient, der man endrer sammensetningen av mobilfasen for å få en ny mobilfaseløsning. Den nye mobilfasen vil ha endret selektivitet og elueringsstyre i forhold til den tidligere mobilfasen og dermed endre elueringshastigheten til analyttene slik at det blir bedre separasjon mellom kromatogramtoppene.

Av de analyttene som inngår i analysen av amfetaminer og ritalinsyre, er ritalinsyre analytten med kortest retensjonstid, etterfulgt av henholdsvis MDA, amfetamin, MDMA og metamfetamin. Årsaken til dette er at MDA og amfetamin har en aminogruppe på enden av karbonkjeden og er dermed mer polar og påvirkes i større grad av de polare egenskapene til mobilfasen. Ritalinsyre har både aminogruppe og karboksylsyregruppe som gjør den til den mest polare blant analyttene og har dermed kortest retensjonstid. Oversikt over dette kan sees i tabell 1.1.

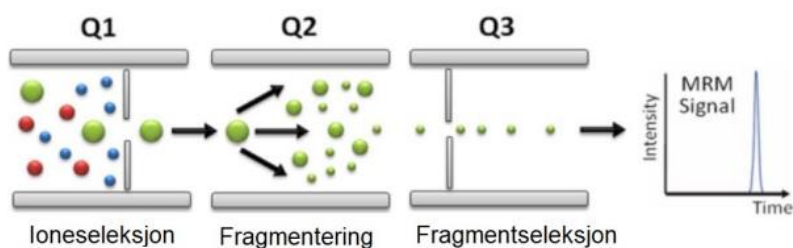
Tabell 1.1: Kjemisk struktur og retensjonstiden til analyttene

Analytt	Struktur	Retensjonstid (min)
Amfetamin		1,47
Metamfetamin		1,60
MDA		1,43
MDMA		1,55
Ritalinsyre		0,92

MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

1.3 Deteksjon ved massespektrometri

Etter separasjon i kolonnen, føres analyttene videre til et massespektrometer hvor de detekteres. I massespektrometeret ioniseres forbindelsene og måles etter masse/ladning-ratio (m/z -ratio). Massespektrometeret består av en ionekilde, kollisjonscelle, to seleksjonskilder og en detektor, som etter tur ioniserer, fragmenterer, selekterer og detekterer hvilke ioner som skal passere som illustrert i figur 1.3.

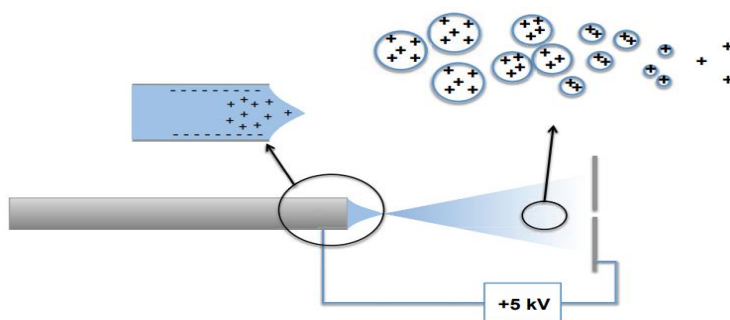


Figur 1.3: Figuren viser forenklet skisse av oppbygningen til et massespektrometer. Q1 og Q3 viser seleksjonscellene/kvadrupolene og Q2 viser kollisjonscellen. [5]

Ionisering

På vei ut av kolonnen, føres mobilfasen med analyttene til ioniseringskilden via et kapillærrør med høy spenning. Den høye spenningen vil føre til dannelsen av ladde dråper, som sprayes inn til ionekilden. Den høye temperaturen til ionekilden gjør at nitrogengass-molekylene (N_2) som er til stede i ionekilden har stor hastighet og gjør slik at N_2 kolliderer med de ladde dråpene.

Kollisjonen med N_2 fører til at de ladde dråpene fragmenteres til mindre dråper. Dette medfører at de frastøtende kreftene inni dråpen vil bli større enn overflatespenningen, og dråpen eksploderer til enda mindre dråper. Denne prosessen kalles for elektronsprayionisering og repeteres flere ganger helt til dråpene er i gassform.[13] Denne prosessen er illustrert i figur 1.4.



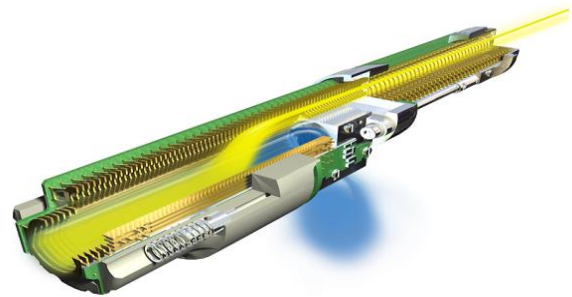
Figur 1.4: Skisse av ioniseringsprosessen ved massespektrometri [2]

Ioneseleksjon

Forbindelser som er i gassform drives videre inn i massespektrometeret ved et gradvis synkende trykk som danner gradert vakuum gjennom instrumentet som suger analyttene mot detektoren. Før analyttene ankommer første seleksjonskilde, går de gjennom en ionekanal som fokuserer ionestrålene slik at forurensende stoffer som gasser, overskudd av mobilfase og nøytrale forbindelser blir filtrert bort.

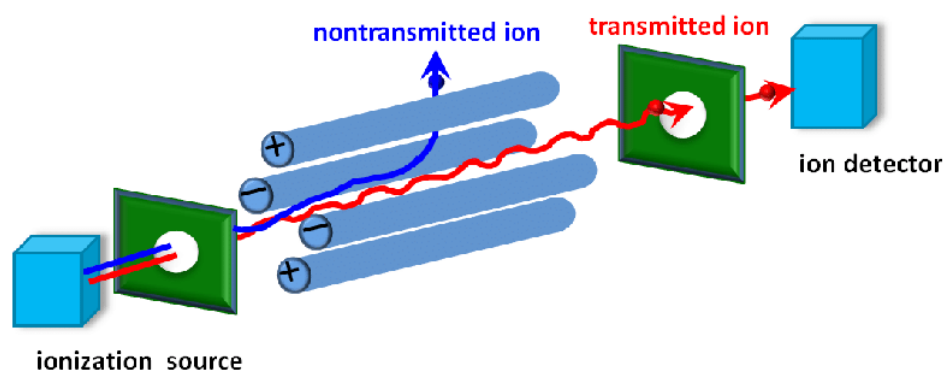
Ionekanalen har en spesiell geometrisk oppbygging der hovedstrålen fra ionekilden deles inn i to kanaler, som vist i figur 1.5.

Forurensende stoffer blir skylt ut via nedre kanal, mens forbindelser i ioneform blir trukket opp til den øvre kanalen og ført videre til første seleksjonskilden som er en kvadrupol masseanalysator.[4]



Figur 1.5: Figuren viser ionekanalene hvor forurensende stoffer føres ned (markert i blått) og ioner føres opp og videre inn til analysatoren (markert i gult) [4]

En kvadrupol masseanalysator består av fire identiske staver som står parallelt ovenfor hverandre i diamantformasjon med hulrom i midten. Begge motstående staver er koblet til samme strømkilde, slik at den elektriske strømmen gjennom begge staver er lik. Ved bruk av vekslende strømretning i de parvise parallellene, vil man kunne skape et vekslende elektrisk felt. Når ionene kommer inn i dette elektriske feltet, vil de slynges i X- og Y-akser mellom stavene som illustrert i figur 1.6.[2]



Figur 1.6: Oppbygging av en kvadrupol masseanalysator. Banen til ioner som selekteres (rød) og ioner som ikke selekteres (blå). [7]

De fleste ionene vil ha en ustabil bane, kolliderer med en av kvadrupolstavene og vil ikke bli detektert. Ved å justere på strømmen og vekselhastigheten, kan man da bestemme spesifikke ioner som passerer ved utgangspunkt i deres m/z -ratio.

Fragmentering

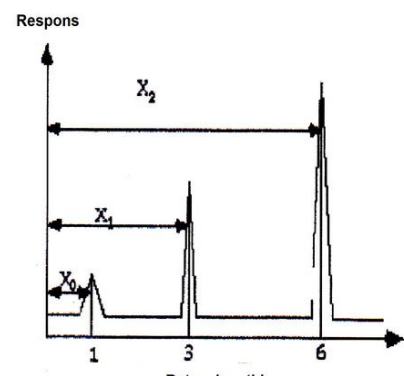
Etter at de utvalgte ionene har kommet ut av den første kvadrupolen, vil de føres inn i en kollisjonscelle der de blir fragmentert til mindre ioner ved at de blandes med argon.

Argonmolekylene kolliderer med ionene slik at de brytes ned til mindre fragmenter. Disse fragmentene kalles “datterioner” og vil ha lavere m/z -ratio enn det opprinnelige “moderionet”. Datterionene som produseres i kollisjonscellen fraktes videre til en ny kvadrupol. I likhet med første kvadrupol vil denne kun slippe gjennom ioner med m/z -ratio til datterionene. Disse datterionene, som slipper gjennom den andre kvadrupolen, føres videre til en detektor som måler spenningen. Denne spenningen amplifiseres og gis ut som et signal. [2, s.85-93]

1.4 Kromatogramtolkning

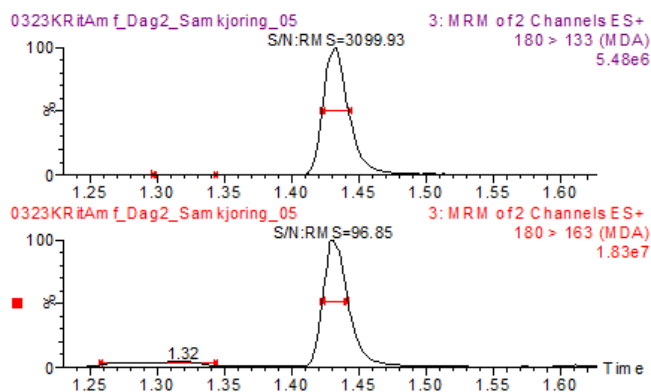
Et kromatogram er en grafisk fremstilling av deteksjonssignalet som funksjon av tid. Ved kromatogram vil deteksjonssignalet være fremstilt i y-aksen, men retensjonstiden vil være i x-aksen. Retensjonstiden som vises i x-aksen er analyttens elueringstid gjennom kolonnen, mens deteksjonssignalet er det elektriske signalet som måles av detektoren i massespektrometeret. Figur 1.7 illustrerer hvordan et slikt kromatogram vil se ut.

Etter fragmenteringen i kollisjonscellen og i den påfølgende kvadrupolen, velges to spesifikke m/z -ratioer som skal passere inn til detektoren. Dette er to datterioner som kalles kvalifiserings- og kvantifiseringsioner. Kvalifiseringsionet er det ionet som brukes for å si om analytten er til stede i prøven, mens kvantifiseringsionet benyttes til å bestemme mengde analytt i prøven. Hva som er kvalifiserings- eller kvantifiseringsion bestemmes ut fra S/N-forholdet til ionet. Ionet som gir høyest S/N-forhold vil ofte brukes som kvantifiseringsion, mens den som gir lavere S/N-forhold, vil være kvalifiseringsion. Figur 1.8 viser forskjell i S/N-forhold mellom kvantifiserings- og kvalifiseringsionet.



Figur 1.7: Figuren viser en illustrasjon av hvordan et kromatogram ser ut [8]

Det vil også undersøkes andre faktorer som interferens og kalibreringskurve hos datterionene. Analyttene og m/z-forholdene til deres tilhørende kvalifiserings- og kvantifiseringsion er presentert i tabell 1.2.



Figur 1.8: Figuren viser kromatogram av MDA i serum. Øverste kromatogrammet er kromatogrammet til kvantifiseringsionet som viser at det er lite støy i forhold til signal til toppen. I nederste kromatogram er det større støyrespons i forhold signalet og dermed er det kvalifiseringsionet.

Tabell 1.2: Oversikt over m/z-ratio til kvalifiserings- og kvantifiseringsionene for analyse av amfetaminer og ritalinsyre. I tillegg vises måleområdene for analyttene

Analytt	Kvantifiseringsion (m/z)	Kvalifiseringsion (m/z)	Måleområde (nmol/l)
Amfetamin	135,9 > 119,0	135,9 > 91,0	25,0 - 2000
Metamfetamin	150,0 > 119,0	150,0 > 91,0	25,0 - 2000
MDA	180,0 > 133,0	180,0 > 163,0	25,0 - 1000
MDMA	195,0 > 133,0	195,0 > 105,0	25,0 - 1000
Ritalinsyre	220,0 > 56,0	220,0 > 174,0	200 - 5000

m/z = masse/ladning. MDA = 2,3-metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-metylendioksymetamfetamin

Til beregning av konsentrasjon ut fra kromatogrammene benyttes en standardrekke med serum-blank og fire standarder på forskjellige, kjente konsentrasjonsnivå til å lage en standardkurve. Ved kvantifisering av analyttene benyttes arealet av kromatogramtoppene, med unntak for amfetamin som benytter høyde av deteksjonssignalet. Dette skyldes at tidligere forsøk har vist store variasjoner i areal-integrering av laveste standard, om følge av at toppene ikke alltid har Gauss-form, noe som førte til unøyaktigheter i resultatene. [19] Ifølge McCoy et al., vil høyde være mer nøyaktig i kvantifiseringen for topper med grunnlinjeforstyrrelser og haledannelse. [17,18]

1.5 Internstandard

Internstandard (IS) er en løsning som tilsettes i alle standarder, kontroller og prøver. Løsningen tilsettes under opparbeidelsen av prøven med den hensikt å korrigere for eventuelle feil som kan oppstå under selve analysen eller allerede i opparbeidelsen. IS har tilnærmet like kjemiske egenskaper som amfetaminene og ritalinsyre, men har noen distinkte avvik som for eksempel isotopendringer. Stoffet som benyttes til IS må ikke være til stede i prøvematerialet.

På bakgrunn av de kjemiske egenskapene forventer man at retensjonstiden til IS og analytten er den samme. Disse kan dog skilles fra hverandre ettersom de har forskjellig masse. IS tilsettes i lik mengde i alle prøver og dermed kan man korrigere for feil, gitt at avviket i retensjonstid er tilsvarende lik for både IS og analytt. Dette kan gjøres fordi man antar at forholdet mellom konsentrasjonene til IS og analytt vil være den samme som forholdet mellom signalstyrkene i instrumentet. Følgelig er det en forutsetning at konsentrasjonen til IS er kjent på forhånd. [2, s.193-195]

I analysen for amfetaminer, er IS følgende stoffer i kjent konsentrasjon: Amfetamin- $^{13}\text{C}_6$, Metamfetamin- $^{13}\text{C}_6$, MDMA- $^{13}\text{C}_6$, MDA- $^{13}\text{C}_6$ og Ritalinsyre-D₄. I ritalinsyren er fire hydrogenatomer erstattet med deuterium og for de resterende analyttene er karbonatomene i benzenringen erstattet med karbonisotoper med ett ekstra nøytron. Dette gir stoffene en større masse uten å endre betraktelig på egenskapene. Strukturene til IS er vist i tabell 1.3

Tabell 1.3: Strukturene til IS som benyttes

IS	Struktur
Amfetamin-13C6	
Metamfetamin-13C6	
MDMA-13C6	
MDA-13C6	
Ritalinsyre-d4	

MDA = 2,3-metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-metylendioksyamfetamin. IS = Internstandard

1.6 Valideringskriterier

Til den forenklede valideringen av Xevo TQ-XS, er det satt flere valideringskriterier som må innfris før detektoren kan tas i bruk. Verdiene og kravene beskrevet i punktene under er satt ved laboratoriets egen forsknings og utviklings-gruppe, etter internasjonale standarder.

1.6.1 Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrense er nederste konsentrasjonsnivå hvor man kan gi ut svar. I dette tilfellet er det ikke ønskelig å finne ut hva nederste kvantifiserbare nivå er. Her skal det undersøkes om måleparameterne fra tidligere rutineinstrument er direkte overførbare til det nye instrumentet. Det skal altså undersøkes om Xevo TQ-XS kan kvantifisere analytten ved samme nivå som Xevo TQ-S. anbefalte kriterier for kvantifiseringsgrensen er:

- $S/N_{\text{Kvalifiseringsion}} \geq 10$
- $S/N_{\text{Kvantifiseringsion}} \geq 30$
- Nøyaktighet: avvik innenfor $\pm 20\%$
- Variasjonskoeffisient (CV): innenfor $\pm 20\%$

1.6.2 Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarhet tester hvorvidt analysemetoden produserer de samme svarene på kjente prøver over forskjellige dager og bestemmes ved å analysere tre prøver med tre forskjellige standardiserte konsentrasjoner. I dette forsøket brukes QC til å teste reproduserbarheten ettersom de alltid opparbeides og analyseres sammen med prøvene. Verdiene fra hvert konsentrasjonsnivå på alle dagene rapporteres som gjennomsnitt og CV.

Reproduserbarhetsdata benyttes også til å beregne nøyaktighet ved å regne ut avvik fra teoretisk verdi. I tillegg til pasientprøver tester laboratoriet ritalinsyre som en del av sammenlignende laboratorieprøving (SLP), gjennom det britiske selskapet LGC, som en eksternt nøyaktighetssjekk opp mot andre laboratorier. Nøyaktigheten gis som en Z-verdi, som beregnes ved å trekke prøvens teoretiske verdi fra målt ritalinsyreverdi og dele svaret på standardavvik (SD) mellom prøvesvarene fra de andre laboratoriene som er med i SLP-programmet (formel 1.1)

$$Z = \frac{\text{Målt verdi} - \text{Teoretisk verdi}}{SDPA} \quad (1.1)$$

SDPA = Standardavvik målt mellom prøvesvar fra andre laboratorier, Z = nøyaktighet

Laboratoriet har anbefalte akseptkriterier for:

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

1.6.3 Matrikseffekt

Matrikseffekt (ME) måles for å undersøke om det er interfererende stoffer i pasientserum. Den bestemmes på to konsentrasjonsnivåer tilsvarende QC1 og QC3, og gjøres ved å analysere seks serumprøver i hvert av konsentrasjonsnivåene. QC-prøvene opparbeides først uten analytt, og blir reløst i direkteløsning som inneholder analytt i konsentrasjonsnivåene til QC1 og QC3. I tillegg til QC-prøvene, analyserer man ren direkteløsning for hver av konsentrasjonene.

I måleinstrumentet sammenligner man analytt i spiket 0-serum med konsentrasjonen i tilsvarende direkteløsning. Forskjellen mellom disse prøvene vil teoretisk skyldes ME. For prøver med mye ME, benyttes IS for å korrigere for dette. Dette kan gjøres kun dersom IS påvirkes på samme måte som analytten. Man ser dette ved å se på arealratioen mellom analytt og IS og sammenligner med ratioen mellom direkteløsning og IS.

Ønsket ME måles i utbytte av analytt mellom hvert analysesett med og uten matriks. Resultatet må være mellom 75-125%, hvor 100% tilsier ingen ME. Et utbytte over 100% betyr at ioniseringen er forsterket av matriksen, mens utbytte under 100% betyr undertrykt ionisering. Variasjon i ME mellom de seks prøvene må være $\leq 15\%$.

$$Utbytte\% = \frac{Intensitet_{prøve}}{Intensitet_{kontrollprøve}} \cdot 100\% \quad (1.2)$$

1.6.4 Robusthet

Robusthet forstås her som evnen til å gi riktig analysesvar utover i et analyseoppsett. Kvalitetskontroll (QC) med mellomstor konsentrasjon (QC2) analyseres to ganger, først tidlig i analyseserien og senere helt sist i serien, der den siste prøven kalles driftskontroll. Dette gjøres i tre analyseserier fordelt på tre forskjellige dager. Resultatet vurderes i prosentvis forskjell mellom QC-verdiene og vil gi en indikasjon på om analysemetoden er stabil og at det ikke har oppstått noen feilkilder underveis. Eksempel på feilkilder man vil utelukke kan være kolonneslitasje, lekkasjer etc. Formelen for utregning er vist i formel 1.3. Resultatet kan ikke overstige kravene for reproduserbarhetsforsøket.

$$Robusthet = \frac{QC2_2 - QC2_1}{QC2_1} * 100\% \quad (1.3)$$

QC = Kvalitetskontroll

1.6.5 Internstandard-recovery

IS-recovery er hvor mye IS-areal/høyde i prøvene varierer sammenlignet med gjennomsnitt av IS-areal/høyde for standardrekken. Man undersøker IS-recovery i samtlige standarder, kontroller og prøver og for alle analytter analysert på tre forskjellige dager. IS-avvik beregnes først som %avvik mellom prøvenes IS-areal og gjennomsnitt av standardrekkens IS-areal. Avviket brukes til å beregne utbytte av IS ved å trekke avviksprosent fra 100%. Formlene som blir brukt er vist i formel 1.4 og 1.5. Ved analyse av prøver med høy analyttkonsentrasjon kan det oppstå metning i massespektrometret. Dette vil føre at IS-ionene blir undertrykt og deres signal blir redusert [9]. Man kan derfor bruke opplysninger fra dette forsøket til å etablere grenseverdier for hvor store avvik man kan forvente i analysen av amfetaminer og ritalinsyre. De nåværende grenseverdiene for normalvariasjon innstilt ved bruk av detektor Xevo TQ-S er mellom -70% og 100%.

$$IS - avvik = \frac{IS_{areal_{prøve}} - \bar{X}_{IS_{areal_{STD2,3}}}}{\bar{X}_{IS_{areal_{STD2,3}}}} \cdot 100\% \quad (1.4)$$

IS = Internstandard. \bar{X} = gjennomsnitt. Std = standard

$$Utbytte\% = 100\% - \%avvik \quad (1.5)$$

1.7 Problemstillinger

Formålet med denne oppgaven er å validere metode for kvantifisering av amfetaminer og ritalinsyre i serum ved bruk av ny detektor, Xevo-TQ-XS, på UPLC-MS/MS ved å undersøke følgende valideringsparametre:

- Er målte verdier til amfetamin, metamfetamin, MDA, MDMA og Ritalinsyre lineær med korrelasjonskoeffisient $>0,985$ i konsentrasjonsintervallene for amfetamin og metamfetamin (25-2000 nM), MDA og MDMA (25-1000 nM) og for ritalinsyre (200-5000 nM) ved deteksjon på UPLC MS/MS med detektoren Xevo-TQ-XS?
- Vil kvantifiseringsgrense til Std1, målt på tre forskjellige dager, ha en S/N-ratio ≥ 30 for kvantifiseringsionet og ≥ 10 for kvalifiseringsionet med en CV $< 20\%$ og et %avvik fra teoretisk verdi mellom $\pm 20\%$?
- Ved måling av alle tre konsentrasjonsnivå i kontrollrekken på tre forskjellige dager, vil det være en reproducerbarhet og nøyaktighet hvor CV og %avvik fra teoretisk verdi er $\leq 15\%$?
- Kan ME på to konsentrasjonsnivåer, QC1 og QC3, over seks paralleller bestemmes til å være mellom 75-125% med en CV mellom parallellene på $\leq 15\%$?
- Viser analysen av amfetaminer og ritalinsyre robusthet ved å holde avviket mellom QC2 og driftskontroll under 15%?
- Vil variasjonen i areal for IS på alle serumprøver samt standardrekke og kontroller være innenfor kravet: $-70\% < x < 100\%$ avvik fra gjennomsnittet av Std2 og Std3?
- Samsvarer svarene mellom de tre seriene med totalt 210 serumprøver, som er analysert på tre forskjellige dager, på begge instrumentene ved at %avvik mellom svarene til instrumentene er $\leq 15\%$?

2. MATERIALE OG METODE

2.1 Prøvemateriale

Standarder og kontroller

I hvert analyseoppsett ble det brukt en standardrekke bestående av fem standarder, samt tre kontroller i forskjellige konsentrasjonsnivåer. Den laveste standarden, Std0, var 0-serum som ble benyttet som en prøveblank. De øvrige standardene i standardrekken inneholdt analytt i forskjellig konsentrasjonsnivå spredt over hele måleområdet for analysen. Kontrollrekken var også over et større måleområde innenfor rapporteringsgrensen. Oversikt over standarder og kontroller og konsentrasjonsnivåene til analyttene sees i tabell 2.1 og 2.2

Tabell 2.1: Teoretisk konsentrasjon til analyttenes standarder

	Standard 1 (nM)	Standard 2 (nM)	Standard 3 (nM)	Standard 4 (nM)
Amfetamin	25	75	1000	2000
Metamfetamin	25	75	1000	2000
MDA	25	75	500	1000
MDMA	25	75	500	1000
Ritalinsyre	200	500	2500	5000

MDA = 2,3-Metylendioksiyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

Tabell 2.2: Teoretisk konsentrasjon til analyttenes kontroller

	Kontroll 1 (nM)	Kontroll 2 (nM)	Kontroll 3 (nM)
Amfetamin	40	200	1500
Metamfetamin	40	200	1500
MDA	40	150	800
MDMA	44	165	863
Ritalinsyre	300	750	4000

MDA = 2,3-Metylendioksiyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

Ved tillaging av standardrekke og kontroller, ble tørrstoff veid og løst i metanol til bruksløsning. Deretter ble bruksløsningen blandet med 0-serum i forskjellige forhold slik at man får standarder og kontroller i forskjellige konsentrasjonsnivå.

Pasientprøver

Til forsøkene ble det benyttet serumprøver som inneholdt en eller flere av amfetaminene eller ritalinsyre. Serumprøvene som ble brukt var pasientprøver, tillaget prøver og SLP.

Pasientprøvene som ble benyttet i dette prosjektet var bekreftede positive, anonymiserte prøver. På grunn av mangel på positive pasientprøver, ble det benyttet spikede prøver. Spikede prøver ble i likhet med standardrekken og kontrollene laget ved å blande bruksløsning med 0-serum.

2.2 Reagenser og utstyr

Reagenser og utstyr som ble brukt i forsøkene er presentert i tabell 2.3 og tabell 2.4

Tabell 2.3: Reagenser og deres bruksområde

Reagens	Bruksområde
Acetonitril	Mobilfase/felling
Maursyre	Fellingsreagens
Ammoniumformat (5mM i vann)	Mobilfase
Metanol (10% i vann)	Reløsning

Tabell 2.4: Oversikt over utstyr og instrumenter

Utstyr/Instrumenter	Bruksområde	Produsent
Hamilton ML Star	Pipetteringsrobot	Hamilton Robotics AB
Tecan Freedom EVO	Pipetteringsrobot	Tecan Schweiz AG
OSTRO(TM) 96-Well Plate 25 mg 1/Pkg	Filtreringsplate	Waters
96-dypbrønnsplate, 2 mL	Oppsamlingsplate	Waters
Positive Pressure 96-Processor	PPP-filtrering	Waters
Ultravap Sample Concentrator	Inndampingsenhet	Porvair Sciences
Co-mix Multi-format	Platemikser	VITL/Teknolab
ACQUITY UPLC® I-Class	UPLC-instrument	Waters
XEVO TQ-XS	MS/MS-detektor	Waters

2.3 Prøveopparbeidelse

Std, QC og prøver som skal opparbeides ble først satt i Hamilton SL pipetteringsrobot, der det ble pipettert Std, QC og prøve (100µL) til en designert brønn på 96-brønns Ostroplate. Pipetteringsroboten overførte deretter IS (50µL) til hver brønn som skal opparbeides. Til slutt ble det pipettert over fellingsreagens (375µL) til hver brønn som skal opparbeides. Fellingsreagenset som ble benyttet, var acetonitril m/ 1% maursyre og var iskald ved bruk.

Hele Ostroplaten ble videre montert på en 96-brønns analyseplate og satt videre over på en Positiv Pressure 96 Processor (PPP). Prøvene ble satt under ca. 2 PSI filtreringstrykk i 2 minutt. Etter 2 minutter øktes filtreringstrykket til ca. 4-6 PSI i ytterligere ett minutt.

Oppsamlingsplate med filtrert prøvemateriale ble satt til inndamping (40°C, 40 minutter). Deretter ble det inndampede prøvematerialet reløst i 10% metanol i vann (100µL). Dette ble gjort av pipetteringsroboten Tecan Freedom EVO. Etter reløsning, ble prøvene forseglet og mikset (2100 RPM, 1 min).

Fremgangsmåte matrikseffekter

Til forsøket om ME var opparbeidelsen lik som i de andre forsøkene, dog med noen avvik. I opparbeidelsen, frem til reløsning, ble kun 0-serum benyttet. Til forsøket ble det satt av seks brønner til hver av konsentrasjonsnivåene til QC1 og QC3. Etter inndamping ble 0-serum reløst i direkteløsning (100 µL) med konsentrasjoner tilsvarende disse nivåene. I tillegg til disse tolv prøvene, ble det tilsatt QC1 og QC3 direkteløsning i ytterligere tre brønner hver. Til sist ble IS (10 µL) overført til samtlige brønner. Til reløsning og brønner med kun direkteløsning, ble pipetteringen gjort manuelt.

2.4 UPLC-MS/MS instrumentinnstillinger

Analysebetingelser og instrumentinnstillinger i UPLC-MS/MS er gitt i tabell 2.5- tabell 2.7.

Tabell 2.5: Analysebetingelser og instrument innstillinger for UPLC

Kolonne	Acquity UPLC BEH C18 1,7 µm (2,1* 50 mm)
Kolonne-temperatur	50°C
Autosampler-temperatur	10°C
Injeksjon volum	2µL
Pre injeksjon vask	10 s
Post injeksjon vask	15 s
Mobilfaser	Løsning A: 5mM NH ₄ -format pH 10,1 Løsning B: Acetonitril

Endringshastigheten av mobilfasesammensetning bestemmes av gradientkurvene. Kurvene beskriver forholdet mellom endring i mobilfasesammensetningen (flow) og kjøringstiden til hver enkelt mobilfase (segmenttid). Kurve 6 har et lineært forhold mellom aksene slik at mobilfasesammensetningen vil bli endret i takt med segmenttiden. For kurve 1 og 11 er det ingen linearitet dermed vil endringer skje momentant og uavhengig av segmenttiden. Ved kurve 1 vil sluttsammensetningen oppnås før segmentet starter, mens ved kurve 11 vil slutt sammensetningen oppnås etter segmentet er ferdig.

Tabell 2.6: Gradientprogram brukt i UPLC

Segmenttid (min)	NH ₄ -format pH 10,1 (5mM) (%)	Acetonitril (%)	Flow (ml/min)	Kurve
1,0	95	5,0	0,6	initial
2,0	72	28	0,6	6
2,2	2,0	98	0,6	6
3,0	95	5,0	0,6	1
3,2	95	5,0	0,6	1
10,0	95	5,0	0,0	11

Tabell 2.7: Analysebetingelser og instrumentinnstillinger for MS.

Detektor	Xevo TQ-XS
Instrumentsoftware	MassLynx
Kapillærspenning	1,0 kV
Ionekildetemperatur	120°C
Desolvation temperatur	650°C
Cone gas flow	150 l/h
Desolvation gas flow	1000 l/h
Gain	0,5

Desolvation temperatur = temperatur på N₂-gass som benyttes til ionisering av analytter. Desolvation gas flow = strømhastigheten til gassen. Cone gas flow = Strømhastighet på argongass som benyttes i kollisjonscellen.

2.5 Databehandling

MassLynx Software fra Waters Corporation ble brukt til å behandle data fra massespektrometeret. Denne dataen ble direkte overført fra måleinstrumentet til databehandlingsprogrammet TargetLynx, som inngår i programvaren til MassLynx. Her ble kromatogram for standardrekker vurdert visuelt. Datasett fra TargetLynx ble videre ført til Excel for statistisk beregning.

2.6 Valideringsparametere

Linearitet

Til undersøkelse av lineariteten ble det benyttet fire standarder (1-4) innen måleområdet, oppgitt i tabell 1.2, målt over tre forskjellige dager. I tillegg ble det i den første analyseserien benyttet en ekstra standard (Std5) med dobbel konsentrasjon av den høyeste standarden i måleområdet, for å undersøke linearitet i konsentrasjonsnivåer høyere enn måleområdet. Resultatet til standardrekken ble ført videre til programvaren TargetLynx for å tilpasse en lineær regresjonskurve med $1/x$ vekting og origo ekskludert.

Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen ble undersøkt ved å analysere laveste standard i tre forskjellige dager. Laveste standarden som ble benyttet er Std1 og har teoretisk konsentrasjon på 25 nM for amfetaminene og 200 nM for ritalinsyre. Std1 ble analysert som en del av standardrekken sammen med tre andre standarder og tre kvalitetskontroller. Resultatet av Std1 ble videre benyttet til å undersøke S/N-forholdet for hver analytt for hver dag. Dette ble undersøkt ved å sammenligne areal til kvantifisering- og kvalifiseringsion i forhold til areal av støysignal.

Reproduserbarhet og nøyaktighet

Ved undersøkelse av metodens reproduserbarhet og nøyaktighet ble det benyttet tre kvalitetskontroller fordelt over måleområdet. Kvalitetskontrollene ble analysert som en del av standardrekken i tre analyseserier som ble utført over tre forskjellige dager. Resultat av QCene ble brukt til å undersøke reproduserbarheten ved å beregne %CV mellom parallellene. Nøyaktigheten ble undersøkt ved å sammenligne gjennomsnittlig resultat av QCer mot teoretisk verdi. I tillegg ble metodens nøyaktighet også undersøkt ved SLP_{er} som ble analysert de tre forskjellige dagene. Konsentrasjonen til SLP_{ene} ble videre benyttet til beregning av Z-verdier, se punkt 1.6.2 (s.11).

Matrikseffekter

ME-forsøket ble utført ved analyse av lav og høy kvalitetskontroll i serum og direkteløsning tilsatt IS. Det ble lagd 3 paralleller av direkteløsning for hver QC og 6 paralleller i serum for hver kontroll, se punkt 2.3 (s.16). Resultatene av målingene ble ført videre til Excel der det ble beregnet ME med og uten IS-korrigerings. Ved undersøkelse av ME uten IS-korrigerings ble det beregnet prosentutbytte av gjennomsnittlig toppareal til serumløsningene i forhold til gjennomsnittlig toppareal av direkteløsningene. ME med IS-korrigerings ble beregnet ved å benytte ratio mellom analytt-topphøyde og IS-topphøyde for amfetamin og analytt-toppareal og IS-toppareal for øvrige analytter. Det ble beregnet prosentutbytte av gjennomsnittlig ratio av serumløsningene i forhold til gjennomsnittlig ratio av direkteløsningene.

Robusthet

Robusthet ble undersøkt ved å analysere to paralleller av QC2 i en analyseserie. QC2 ble analysert i starten av analyseserien i standardrekken og på slutten av analyseserien(driftskontroll). Dette forsøket ble utført i tre forskjellige analyseserier over tre forskjellige dager. Målte konsentrasjoner og areal/høyde av QC2 som ble analysert først i analyseserien ble benyttet som fasitverdi og det ble beregnet avvik (%) av konsentrasjoner og arealer/høyder for QC2 som ble analysert i slutten. Resultatene ble ført videre til Excel der det ble beregnet største og minste avvik for konsentrasjon, topp- og IS-areal for alle analyttene som undersøkes, unntatt amfetamin som beregnes ved topp og IS-høyde.

IS-Recovery

IS-variasjonen ble undersøkt i tre analyseserier med standardrekker og 80 pasientprøver fordelt over disse tre analyseseriene. Analyseseriene ble utført på tre forskjellige dager, hvor det ble opparbeidet ny standardrekke for hver serie. IS-recovery ble beregnet først som %avvik mellom arealet/høyde til IS i en prøve og gjennomsnittlig IS-areal/høyde av Std1-4. Deretter ble utbytte beregnet ved å trekke avviksprosent fra 100.

Instrumentssammenligning

I undersøkelse av samsvar mellom instrumentene ble det benyttet pasientprøver som ble analysert på begge instrumentene samme dag. Pasientprøvene ble fordelt i tre analyseserier som ble analysert på tre forskjellige dager. Pasientprøvekonsentrasjonene ble ført videre til Excel der det ble beregnet %avvik mellom resultatene fra begge instrumentene.

3. RESULTATER OG DISKUSJONER

3.1 Standardkurve – kurvetilpassing og måleområde

Formålet for dette forsøket er å undersøke grad av lineær sammenheng mellom deteksjonssignal og konsentrasjon av analytt i en prøve. Korrelasjonskoeffisienten, R, beskriver hvor godt en kurve er tilpasset en lineær linje. R-verdi for standardkurver innen måleområdet samt R-verdi for kurver med ekstra standardnivå (Std5) er presentert i tabell 3.1.

Tabell 3.1: Måleområder for analyttene, samt R-verdi for standardkurver i måleområdene og standardkurver med ekstra standardnivå.

Analytt	Måleområde [nM]	R (N=3)	R _{Std5} (N=1)
Amfetamin	25-2000	0,9998	0,9999
Metamfetamin	25-2000	0,9999	0,9998
MDA	25-1000	0,9999	0,9999
MDMA	25-1000	0,9999	0,9999
Ritalinsyre	200-5000	0,9999	0,9997

N=Antall paralleller av hver standard. MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin. Std5 = Standard 5

Anbefalte akseptkriterier for lineære kurver er at R skal være >0,985. Dette blir innfridd av samtlige analytter i måleområdet. Grafisk fremstilling av kurvene ligger i vedlegg B.

Std5, med dobbelt konsentrasjon av høyest konsentrert standard i måleområdet, ble brukt til å analysere standardkurvens linearitet i områder høyere enn måleområdet. Resultatene og grafisk fremstilling av kurvene er presentert i henholdsvis tabell 3.1 og vedlegg C. Alle analyttene oppfylder kravet for standardkurven med Std5, som betyr at kurvene er lineære i konsentrasjonsnivå høyere enn måleområdet.

3.2 Kvantifiseringsgrense

Kvantifiseringsgrensen til metoden er validert på tidligere detektor og til dette forsøket ble det undersøkt om det kunne beholdes på den nye detektoren. S/N-ratioen ble vurdert i konsentrasjon tilsvarende Std1 da dette er laveste grense for positive svar.

Kvantifiseringsgrensen er satt til å være godkjent når S/N-ratioen for kvalifiserings- og kvantifiseringsionene er henholdsvis ≥ 10 og ≥ 30 . Til beregning av dette, ble peak-to-peak-funksjonen i MassLynx brukt som vist i figur 1.8. I tillegg er det krav om CV og % avvik lavere enn 20%. Måleparameterne for analyttene i tre analyseserier er presentert i tabellen 3.2 under. Kromatogram for målingen er vist i vedlegg A.

Tabell 3.2: Gjennomsnitt, SD, CV, nøyaktighet og minste S/N-ratio for kvantifiserings- og kvalifiseringsionet fra tre forskjellige dager.

Analytt	Teoretisk-verdi (nM)	Gj.snitt målt verdi (nM)	SD	CV [%]	Nøyaktighet [%]	S/N Kvantifiseringsion	S/N Kvalifiseringsion
Amfetamin	25,0	25,3	0,72	2,8	1,1	1298	439
Metamfetamin	25,0	25,4	0,36	1,4	1,4	5356	1535
MDA	25,0	25,2	0,08	0,30	0,87	1659	70
MDMA	25,0	25,1	0,03	0,11	0,47	3856	6147
Ritalinsyre	200	203	0,67	0,33	1,7	20033	847

SD = Standardavvik. CV = variasjonskoeffisient. S/N = Signal/Noise. MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin.

MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

Resultatene viser at S/N-ratioen for både kvantifiserings- og kvalifiseringsionet er innenfor kravet (≥ 30 og ≥ 10) med CV og avvik fra teoretisk verdi lavere enn 20%. Forsøket antyder at alle kravene for samtlige analytter og kvantifiseringsgrensen kan beholdes.

3.3 Reproduserbarhet og nøyaktighet

I dette forsøket måles metodens mellom-serie-variasjon og nøyaktighet. Forsøket viser om metoden produserer samme resultat på samme prøvemateriale analysert over flere dager. I tillegg undersøkes nøyaktigheten ved å sammenligne målt konsentrasjon mot teoretisk verdi.

For dette forsøket ble det analysert tre paralleller av kvalitetskontroller i tre forskjellige konsentrasjonsnivåer. Analyseseriene ble utført over tre forskjellige dager. Gjennomsnitt av målte konsentrasjoner for QCer, samt CV og nøyaktigheten er presentert i tabell 3.3.

Tabell 3.3: Reproduserbarhet med CV og nøyaktighet for tre analyseserier utført over tre forskjellige dager.

Analytt	Teoretisk konsentrasjon (nM)	Gj.snitt målt konsentrasjon (nM)	SD	CV [%]	Nøyaktighet [%]
Amfetamin	40	40	0,67	1,7	-0,6
	200	203	8,83	4,3	1,6
	1500	1456	17,60	1,2	-2,9
Metamfetamin	40	40	0,85	2,1	-0,7
	200	196	6,07	3,1	-2,0
	1500	1441	15,40	1,1	-4,0
MDA	40	39	0,72	1,8	-2,1
	150	149	2,17	1,5	-0,6
	800	769	10,94	1,4	-3,8
MDMA	44	43	0,75	1,8	-2,9
	165	161	5,93	3,7	-2,4
	863	816	7,33	0,9	-5,5
Ritalinsyre	300	298	5,90	2,0	-0,7
	750	751	15,91	2,1	0,1
	4000	3807	36,49	1,0	-4,8

SD = Standardavvik CV = Variasjonskoeffisient. MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

Z-verdier for åtte SLPer med ritalinsyre er presentert i tabell 3.4. Z-verdiene er beregnet med formel 1.1

Tabell 3.4: Oversikt over standardiserte laboratorieprøver med deres assigned value, SDPA, målte verdi og beregnet Z-verdi.

ID	Assigned value (nM)	SDPA	Målt verdi (nM)	Z-verdi
R221_PST1B	2065	249,68	2336,9	1,1
R221_PST1A	609	119,97	819,8	1,8
R218_PST1B	1248	160,19	1379,4	0,8
R218_PST1A	2143	87,92	2253,6	1,3
R215_PST1B	1696	194,52	1898,3	1,0
R215_PST1A	400	52,16	701,2	5,8
R212_PST1B	537	82,58	595,8	0,7
R212_PST1A	529	54,11	564,1	0,6

SDPA = Standard Deviation for Proficiency Assessment. Z = nøyaktighet. Assigned value er gjennomsnittsverdien til SLPen samlet fra flere andre laboratorier.

Resultatene våre viser at CV på alle QC-nivåer for alle analyttene ligger innenfor anbefalt krav på 15%. Dette viser at metodens mellom-serie-variasjon er godt innenfor kravet.

Nøyaktigheten er målte konsentrasjoners prosentvise avvik fra teoretisk konsentrasjon. Det anbefalte kravet for avvik er <15%. Resultatene fra tabell 3.3 viser at nøyaktigheten for alle analytter er innenfor kravet.

Anbefalt krav for Z-verdi er <2 og som vist i tabell 3.4 ligger alle unntatt én av SLPene innenfor kravet. Denne SLPen ligger godt over kravet. Årsaken til dette er ukjent, men holdbarhet kan være en faktor ettersom prøven er fra 2015. Etersom det er en enkelt feil og ikke gjentakende, kan det overses og nøyaktigheten for de øvrige SLPene kan aksepteres.

3.4 Matrikseffekt

Ved dette forsøket undersøkes ME for å finne ut hvor mye matriksen interferer med deteksjonssignal til analyttene.

Til forsøket for ME, måles utbytte av analytt tilsatt etter opparbeidelse og man ønsker at denne skal være 75-125%. Dette ble undersøkt ved lav og høy QC. Resultatet for ME med og uten IS-korrigerer er presentert i tabell 3.5.

Tabell 3.5: ME på lav og høy QC med og uten IS-korrigerings. Relativ standard avvik mellom parallellene i prosent.

Analytt	Teoretisk verdi	ME [%]	CV [%]	ME-IS [%]	CV-IS [%]
Amfetamin	40	85	3,0	102	7,2
	1500	91	3,0	101	2,0
Metamfetamin	40	92	0,8	99	7,2
	1500	93	1,0	100	1,3
MDA	40	84	4,0	102	6,2
	800	87	3,5	102	1,1
MDMA	40	90	4,6	102	7,2
	800	88	2,8	100	1,0
Ritalinsyre	300	89	1,5	99	6,7
	4000	94	1,0	100	1,6

-IS [%] viser til at tallene er internstandardkorrigeret. ME = matriseeffekter. MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin.

Forsøket viser at ME for prøver som ikke er korrigeret med IS ligger innenfor kravet. Kravet innfris også med IS-korrigerings. CV på alle analyttene er også lavere enn anbefalt krav på <15%. Resultatene viser at ME reduseres med IS-korrigerings ved enkel prøveopparbeidelse med proteinutfelling og fosfolipidfjerning.

Korrigerings med IS gjøres fordi man tar høyde for variasjoner i prøvene. Ved å korrigeres, vil avviket fra sann verdi bli mindre, som vist ved høy QC. Men som presentert i tabell 3.5, fører IS-korrigerings til økning i CV for lav QC. Én av parallellene til IS har areal som er 14% større enn gjennomsnittet av de andre parallellene (vedlegg D). Ved undersøkelse av ME ble IS tilsatt manuelt og unøyaktighet ved pipetterings er trolig årsak til avviket. Dette avviket gjør at CV for IS-korrigeret matriseeffekter blir høyere. Hvis denne parallellen tas ut fra beregningen vil CV bli mindre enn 2,2% for alle analyttene.

3.5 Robusthet

I dette forsøket bestemmes instrumentets robusthet ved å undersøke innen-serie forskyving av konsentrasjon og areal. Hensikten med dette forsøket er å bestemme om det er signifikant forskjell av retensjonstid mellom de første prøvene og siste prøvene i en analyseserie, som følge av slitasje eller andre instrumentrelaterte begrensinger.

Dette gjøres ved å måle %avvik mellom QC2 og driftskontroll. Det ble analysert 29 prøver mellom QC2 parallellene på dag 1 og 33 prøver på dag 2 og 3. Anbefalt akseptkriterier er avvik mindre enn 15%. Minste og største målte %avvik av konsentrasjon, areal/høyde og IS-areal/høyde er presentert under i tabell 3.6

Tabell 3.6: Oversikt over største og minste målte %avvik av konsentrasjon, areal til grafen med og uten IS til hver analytt.

	Minste målte avvik [%]			Største målte avvik [%]		
	Kons.	Areal/Høyde	IS areal	Kons.	Areal/Høyde	IS areal
Amfetamin	-2,6	1,4	1,8	0,5	3,6	3,2
Metamfetamin	-0,1	-1,2	-4,6	5,1	0,9	-0,1
MDA	-0,5	0,4	0,9	2,0	3,0	2,0
MDMA	-0,6	1,9	1,4	2,5	3,9	2,6
Ritalinsyre	-1,1	-4,7	-3,6	0,0	0,4	1,4

MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin. IS = Internstandard

Resultatene viser at konsentrasjonen for QC2 analysert i starten og slutten av analyseserien ikke endret seg utover det satte akseptkriteriet (<15%). Dette gjelder for alle analyttene på de tre dagene de ble analysert. Arealet har heller ikke forskjøvet seg utover akseptkriteriene. Dette antyder at det ikke er nevneverdig forskyvning i konsentrasjon eller areal i analyseserien ved ≤ 33 prøver mellom parallellene, da avvikene ikke er større enn det man forventer ved reproduseringsforsøk.

3.6 Internstandard–recovery

Hensikten dette forsøket var å undersøke hvor mye arealet/høyden av IS avviker i prosent i forhold til gjennomsnitt av IS-areal til Std1-4. Resultatene fra dette forsøket brukes videre for å etablere grenseverdier hvor mye %avvik som kan betraktes som normalt.

IS-recovery ble undersøkt i Std, QCer og 80 pasientprøver fordelt over tre analyseserier, gjennomført på tre forskjellige dager. Høyde for amfetamin-IS og areal for de fire øvrige IS minker med økt analyttkonsentrasjon. Størst avvik i areal for analyttene og avviket for Std5's areal er presentert i tabell 3.7.

Tabell 3.7: Største negative avvik for areal/høyde av IS, samt største positive avvik og avvik for Std5 fra gjennomsnitt av Std2 og Std3

Analytt	Største positive avvik fra gj.snitt [%]	Største negative avvik fra gj.snitt [%]	Avvik for Std5 [%]
Amfetamin	15	-22	-37
Metamfetamin	7,5	-25,9	-30,8
MDA	13,9	-23,2	-25,4
MDMA	14,5	-16,6	-16,8
Ritalinsyre	24,8	-35	-51,7

Std5 = Høyeste standard med dobbelt konsentrasjon av Std4. MDA = 2,3-Metylendioksyamfetamin. MDMA = 2,3-Metylendioksymetamfetamin. IS = Internstandard

Resultatene viser at det er betydelig større avvik å finne på Std5 enn de største avvikene for prøvene som er innenfor måleområdene. At dette avviket er negativt, betyr at signalet til IS er svakere. Reduksjon i signalet er trolig forårsaket av detektormetning forårsaket av at det er mye analytt i prøven som undertrykker signalet fra IS.

Avvikene ligger mellom -52% og 25%, som er innenfor kravet for IS-recovery som er mellom -70% til 100%. Avvikene til Std5 tas ikke med i beregningen av grenseverdier da konsentrasjonen er langt høyere enn målområdet og dermed vil ikke avvikene være resultat av normalvariasjon, men heller detektormetning. Dermed blir de reelle avvikene mellom -35% og 25% som fortsatt er innenfor kravet.

Utbytteprosent, beregnet med formel 1.5, til IS-recovery er innenfor kravet som er mellom 30% og 200%. Da målt forhold til Std1-4 ligger mellom 65% og 125%.

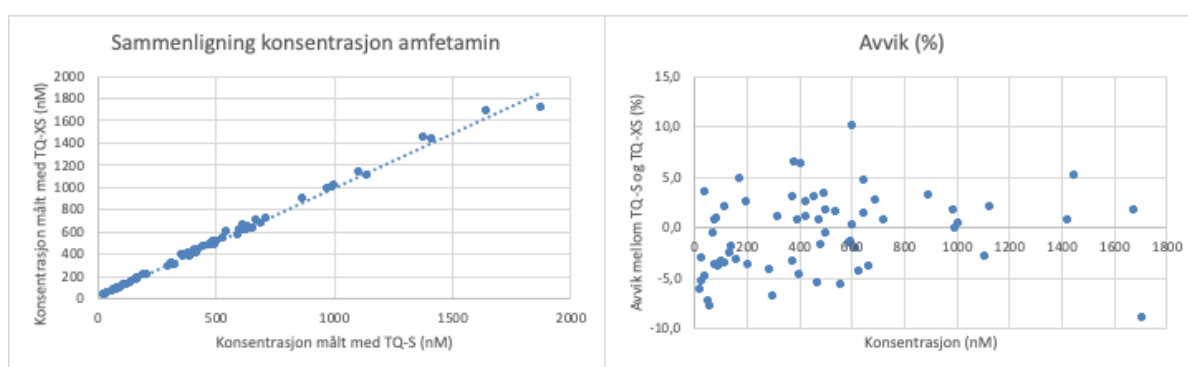
Resultatene viser at IS-variasjonen til både prøver i måleområdene og Std5, er mye mindre enn de nåværende grenseverdiene. Dette viser at normalvariasjonen til IS-areal/høyde er mindre på den nye detektoren og dermed kan det etableres smalere grenseverdier.

3.7 Instrumentsammenligning

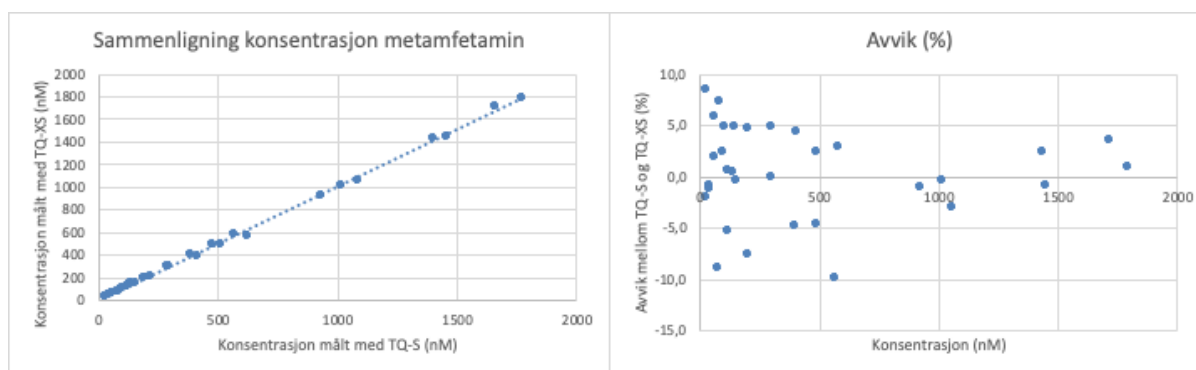
Hensikten med dette forsøket var å sammenligne resultatene fra Xevo-TQ-S og Xevo-TQ-XS for å undersøke om det er signifikante systematiske avvik mellom instrumentene. Til forsøket ble det benyttet pasientprøver som ble analysert på begge instrumentene på samme dag.

Resultatene fra sammenligning av analysemetode med detektor Xevo-TQ-S og den nye detektoren Xevo-TQ-XS for serumprøver er plottet for hver analytt i figur 3.1-3.5.

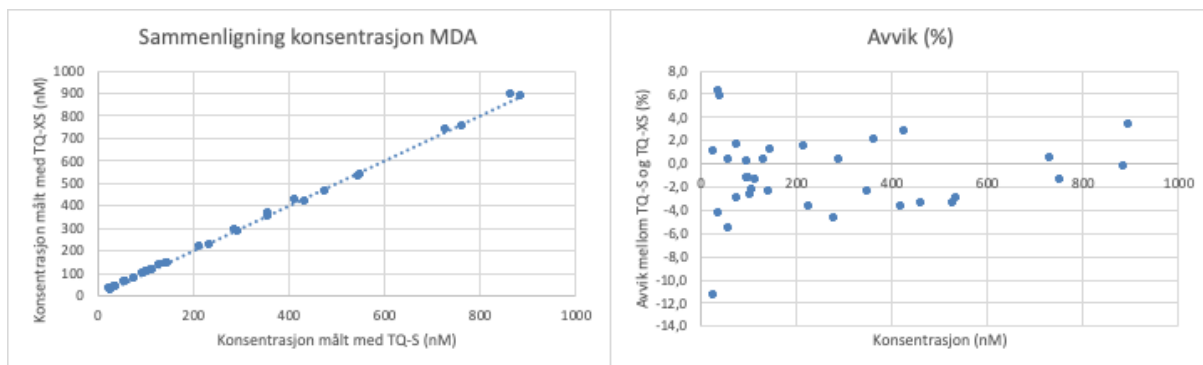
Konsentrasjon i serumprøver fra metode med detektor Xevo-TQ-S og samme metode med ny detektor, Xevo-TQ-XS, er plottet mot hverandre, og avviket mellom metodene er plottet mot konsentrasjonen i den nye metoden.



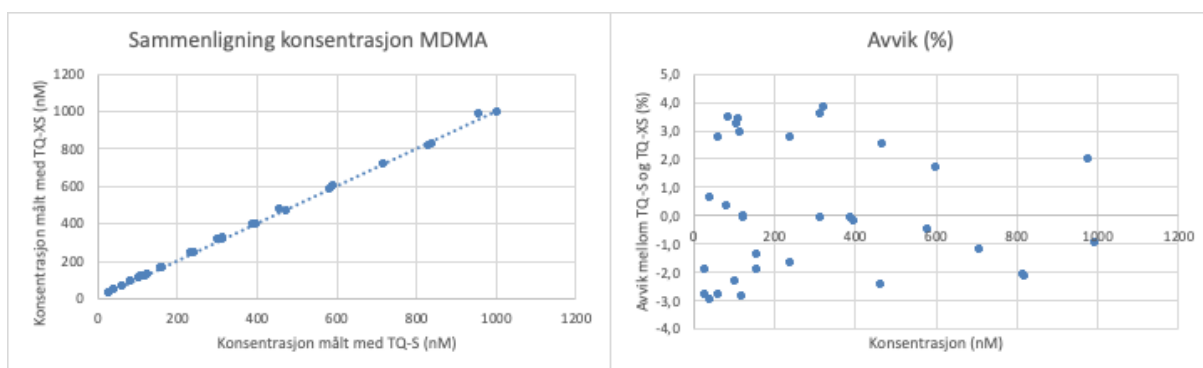
Figur 3.1 Amfetamin: Konsentrasjon i 62 serumprøver TQ-S plottet mot TQ-XS (til venstre) og avvik i målt konsentrasjon mellom TQ-S og TQ-XS plottet mot konsentrasjon (til høyre).



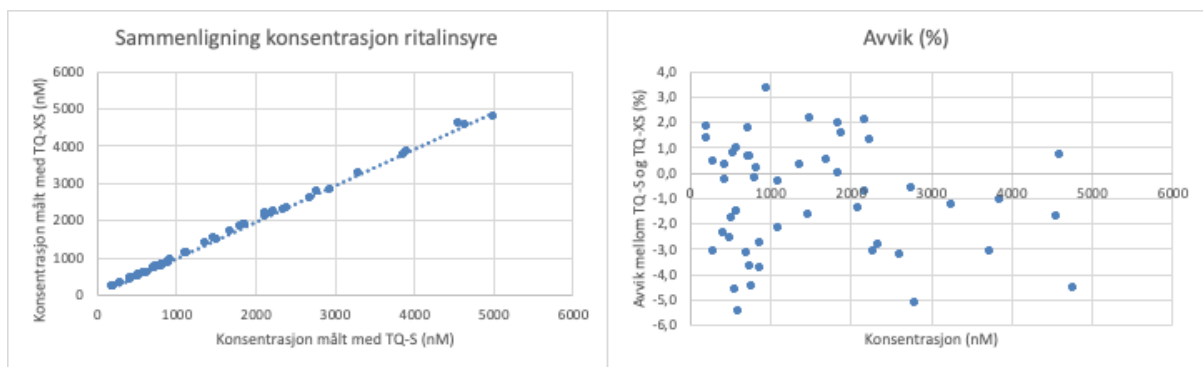
Figur 3.2 Metamfetamin: Konsentrasjon i 32 serumprøver med TQ-S plottet mot TQ-XS (til venstre) og avvik i målt konsentrasjon mellom TQ-S og TQ-XS plottet mot konsentrasjon (til høyre).



Figur 3.3 MDA: Konsentrasjon i 33 serumprøver med TQ-S plottet mot TQ-XS (til venstre) og avvik i målt konsentrasjon mellom TQ-S og TQ-XS plottet mot konsentrasjon (til høyre).



Figur 3.4 MDMA: Konsentrasjon i 33 serumprøver med TQ-S plottet mot TQ-XS (til venstre) og avvik i målt konsentrasjon mellom TQ-S og TQ-XS plottet mot konsentrasjon (til høyre).



Figur 3.5 Ritalinsyre: Konsentrasjon i 50 serumprøver med TQ-S plottet mot TQ-XS (til venstre) og avvik i målt konsentrasjon mellom TQ-S og TQ-XS plottet mot konsentrasjon (til høyre).

Plottene viser at avvikene for alle analyttene er innenfor kravet på <math><15\%</math>. Ingen av analyttene har konsekvent avvikene sine på én side av aksene. Dette tyder på at det ikke er konstant systematisk feil. Prøver med høy konsentrasjon har heller ikke avvik større enn prøver med lav konsentrasjon, noe som viser at avviket ikke øker med konsentrasjonen og tyder på at det heller ikke er proporsjonal forskjell mellom instrumentene.

4. KONLUSJONER

Metoden for kvantifisering av amfetaminene: amfetamin, metamfetamin, MDA og MDMA, samt ritalinsyre i serum valideres på ny detektor, Xevo-TQ-XS, på UPLC-MS/MS.

De undersøkte valideringsparameterne: Linearitet, nedre kvantifiseringsgrense, reproduserbarhet, nøyaktighet, ME, robusthet, IS-recovery, og samsvar mellom nytt og gammelt instrument kommenteres ut fra problemstillingene i punkt 1.7 (s.13)

Laveste R-verdi for amfetaminene og ritalinsyre ble målt til $R=0,9998$ og innfrir kravet på $R>0,985$. For analyse med Std5 ble R målt til $R=0,9997$. Alle verdier er innenfor kravene og metoden viser linearitet, også for verdier over rapporteringsgrensene.

Kvantifiserings- og kvalifiseringsionene har laveste S/N-ratio på henholdsvis 1298 og 70. Avvik fra teoretisk verdi ble lavere enn 1,7% og CV lavere enn 2,8%. Kravene, $S/N >30$ og >10 for kvantifiserings- og kvalifiseringsionene, og avvik og CV mindre enn 20% er innfridd. Nedre kvantifiseringsgrense kan beholdes.

Metoden innfrir krav for reproduserbarhet og nøyaktighet med CV lavere enn 4,3% og avvik lavere enn 5,5%. Dette faller innenfor kravene for CV og %avvik på $<15\%$.

Krav for ME er godkjent med $CV <7,2\%$ og IS-korrigert ME 99-102%. Dette er innenfor kravene på $CV <15\%$ og ME mellom 75-125%.

Med ny detektor er det ingen tegn på forskyvning. %Avvik mellom arealene og konsentrasjon til QC2 kjørt først og sist i analyseoppsettet, er lavere enn 5%. Kravet ($<15\%$) er dermed innfridd. Metoden oppfyller robusthetskravet.

Krav for utbytte, IS-recovery, (30-200%) er innfridd med utbytte i forhold til Std1-4 mellom 65-125%. Grenseverdiene for metodens IS-recovery kan beholdes.

Under instrumentsammenligningen var det ingen av serumprøvene med amfetaminer og ritalinsyre som hadde større avvik enn 11%, noe som faller innenfor kravet på avvik $\leq 15\%$. Alle avvik fordelte seg jevnt i regresjonsplottet. Dette tyder på at det er ingen konstante eller proporsjonale forskjeller og at det er samsvar mellom instrumentene.

Forsøkene viser at Xevo TQ-XS kan benyttes til kvantifisering av amfetaminer og ritalinsyre i serum på UPLC-MS/MS.

REFERANSER

1. Burtis, C. A., & Brunis, D. E. (2015). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7. Edition*. St. Louis: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
2. Lundanes, E., Reubsaet, L., & Greibrokk, T. (2014). *Chromatography; Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
3. Phenomenex. (2013). *Phospholipid Removal Solutions*. Hentet April 03, 2022 fra http://phx.phenomenex.com/lib/br13070413_w.pdf
4. Roberts, M. (2016, Mai 24). *Pumping Ions – An Exercise in Engineering Sensitivity Into the Xevo TQ-XS Mass Spectrometer*. (WATERS) Hentet April 06, 2022 fra https://blog.waters.com/pumping-ions-an-exercise-in-engineering-sensitivity-into-the-xevo-tq-xs-mass-spectrometer?locale=en_US
5. Schmidt, A. P. (2008). Proteomanalyse und Systembiologie. *Biospektrum*, s. 44.
6. Waters. (u.d.). *Column Particle Technologies*. (Waters) Hentet April 04, 2022 fra [https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-\(Ethylene-Bridged-Hybrid\)-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US](https://www.waters.com/waters/en_US/BEH-(Ethylene-Bridged-Hybrid)-Technology/nav.htm?cid=134618172&locale=en_US)
7. Domingues, P. Garcia, A. & Skrzydlewska, E. (red.) (2018). *AACLifeSci Course Companion Manual Advanced Analytical Chemistry for Life Sciences*, s.23.
8. Lausund, S., & Kjøbli, E. (2018, 10 12). *Kromatogram*. Hentet fra MedTekpedia: <https://www.ntnu.no/wiki/display/medtekipedia/Kromatogram>
9. Cappadona, S., Baker, P. R., Cutillas, P. R., Heck, A. J. R., van Breukelen, B. *Current challenges in software solutions for mass spectrometry-based quantitative proteomics. Amino Acids 2012, 43(3), 1087–1108.*
10. David, V., & Moldoveanu, S. (2013). Retention Mechanisms in Different HPLC Types. I *Essentials in Modern HPLC Separations* (ss. 145-190). Elsevier.
11. Stone, J., Nair, H., & Clarke, W. (2017). Sample preparation techniques for mass spectrometry in the clinical laboratory. I J. Stone, *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (s. 37-62). Academic Press.
12. Waters . (2022, april 23). *Xevo TQ-XS Triple Quadrupole Mass Spectrometry*. Hentet fra Waters.com: https://www.waters.com/waters/en_US/Xevo-TQ-XS-Triple-Quadrupole-Mass-Spectrometry/nav.htm?cid=134889751&locale=en_US
13. Stroobant, V., & de Hoffmann, E. (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd.
14. Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. F., SCHOENMAKERS, P., & Lloyd, D. (2013). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Amsterdam: Elsevier.
15. Meyer, V. R. (2010). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. West Sussex: John Wiley and Sons, Ltd.
16. Peters, F. T. (2011). Recent advances of liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. I *Clinical Biochemistry* (ss. 54-65). Elsevier .
17. McCoy, R., Aiken, R., Pauls, R., Ziegel, E., Wolf, T., Fritz, G., & Marmion, D. (1984). Results of a cooperative study comparing the precision of peak height and area measurements in liquid chromatography. *Journal of chromatographic science*, s. 425-431.

18. McCoy, R., Pauls, R., Ziegel, E., Wolf, T., Fritz, G., & Marmion, D. (1986). Results of a cooperative study comparing the precision of peak height and area measurements in liquid chromatography. Part II. *Journal of chromatographic science*, s. 273-277.

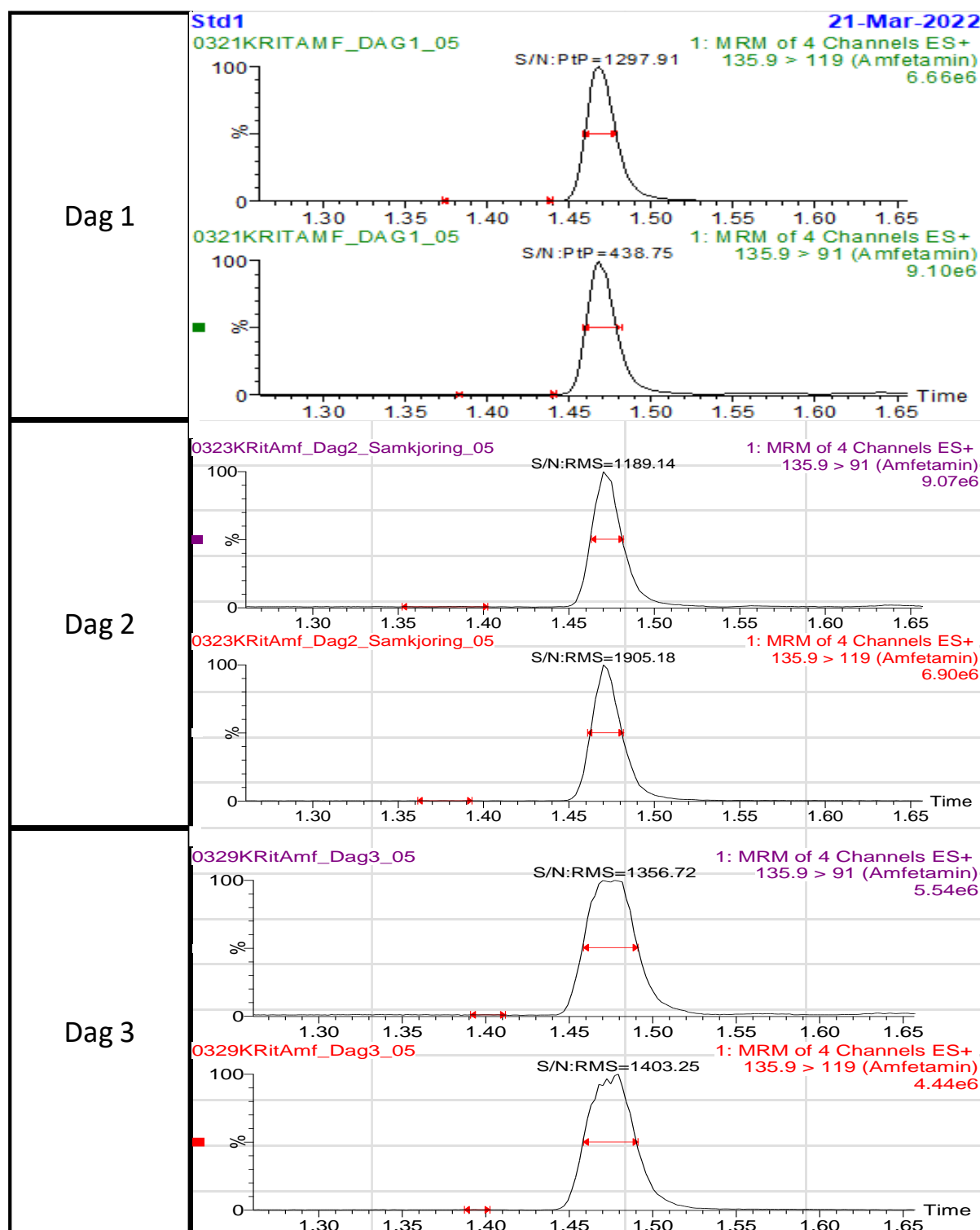
19. Hansen, M. (2018) Validering av analysemetode for amfetaminer, ecstasy-stoffer og ritalinsyre i humant serum med bruk av pipetteringsrobot og UHPLC-MS/MS [Masteroppgave]. NTNU.

VEDLEGG

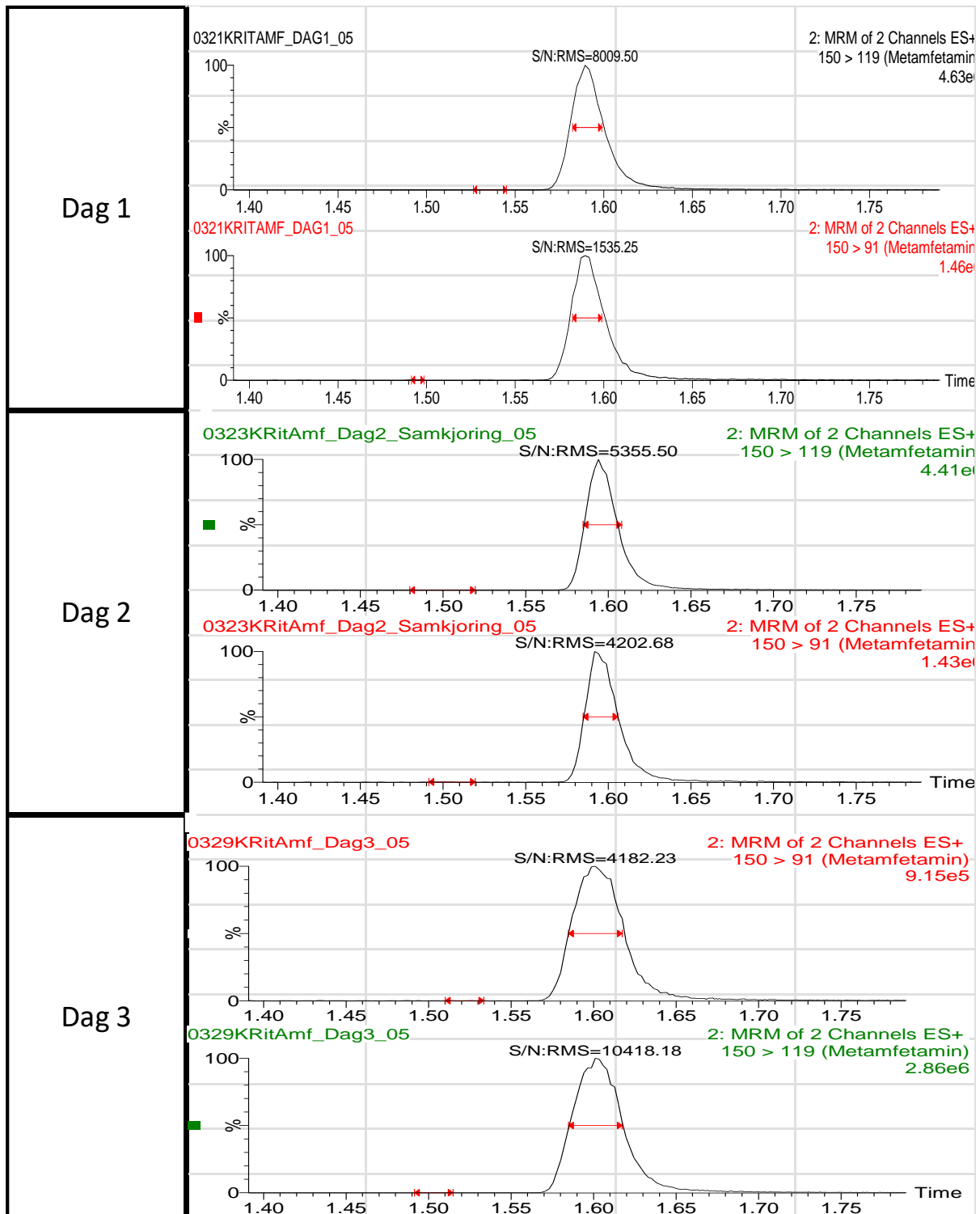
A: Kromatogram for Std1 for alle tre analyseserier med S/N	s.33
B: Standardkurver for alle tre analysedagene	s.38
C: Standardkurver for standardrekker med Høy Std.	s.43
D: Beregningstabeller av matrikseffekter med IS-korrigerings	s.44
E: Utrekningstabeller av reproduserbarhet og nøyaktighet	s.45
F: Rådata fra instrumentsammenligning	s.47
G: Tabell for utregning av robusthet	s.52
H: Rådata IS-areal	s.53
I: Flytskjema RitAmf (ritalinnsyre og amfetaminer)	s.68

Vedlegg A: Kromatogram for Std1 for alle tre analyseserier med S/N

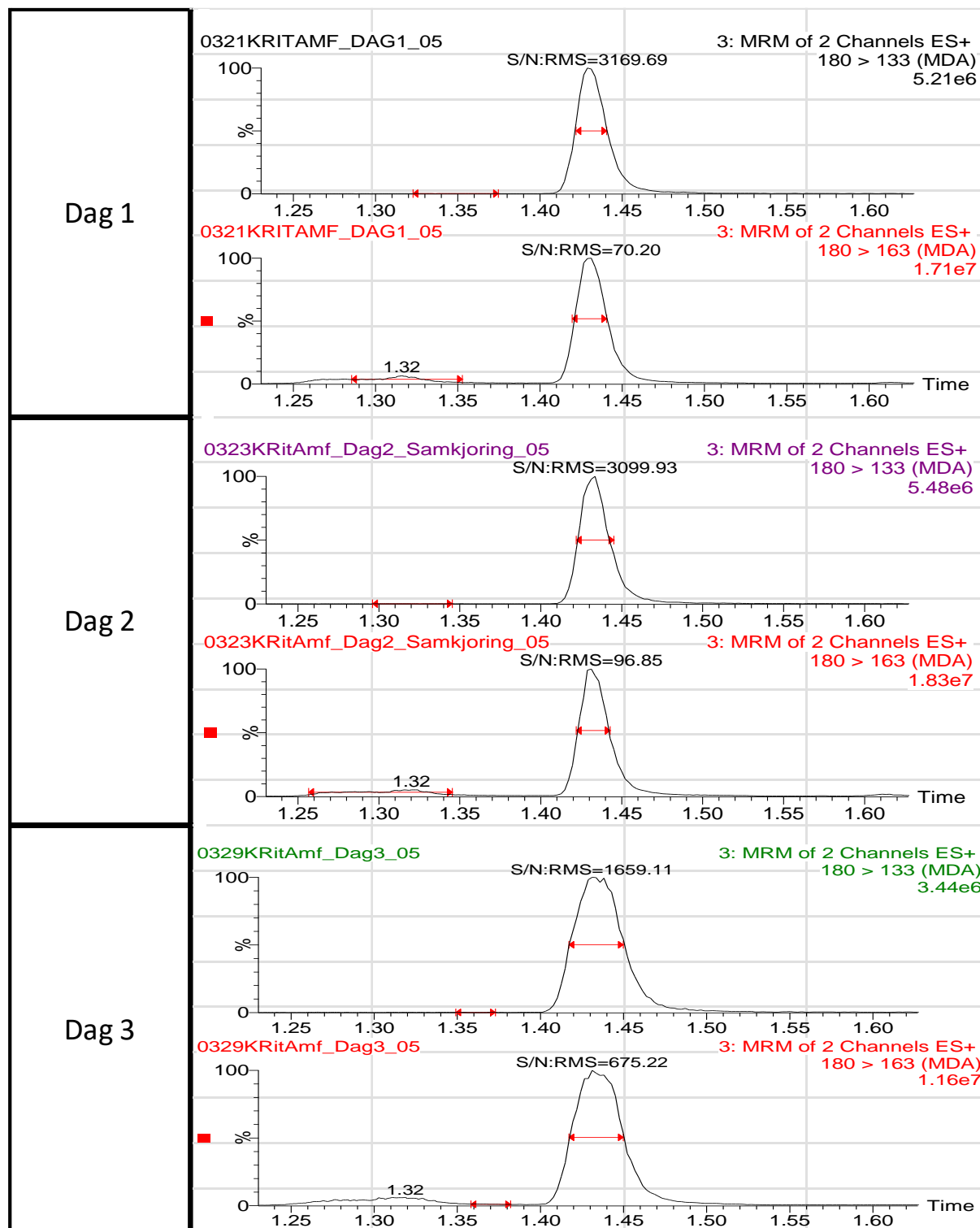
Amfetamin:



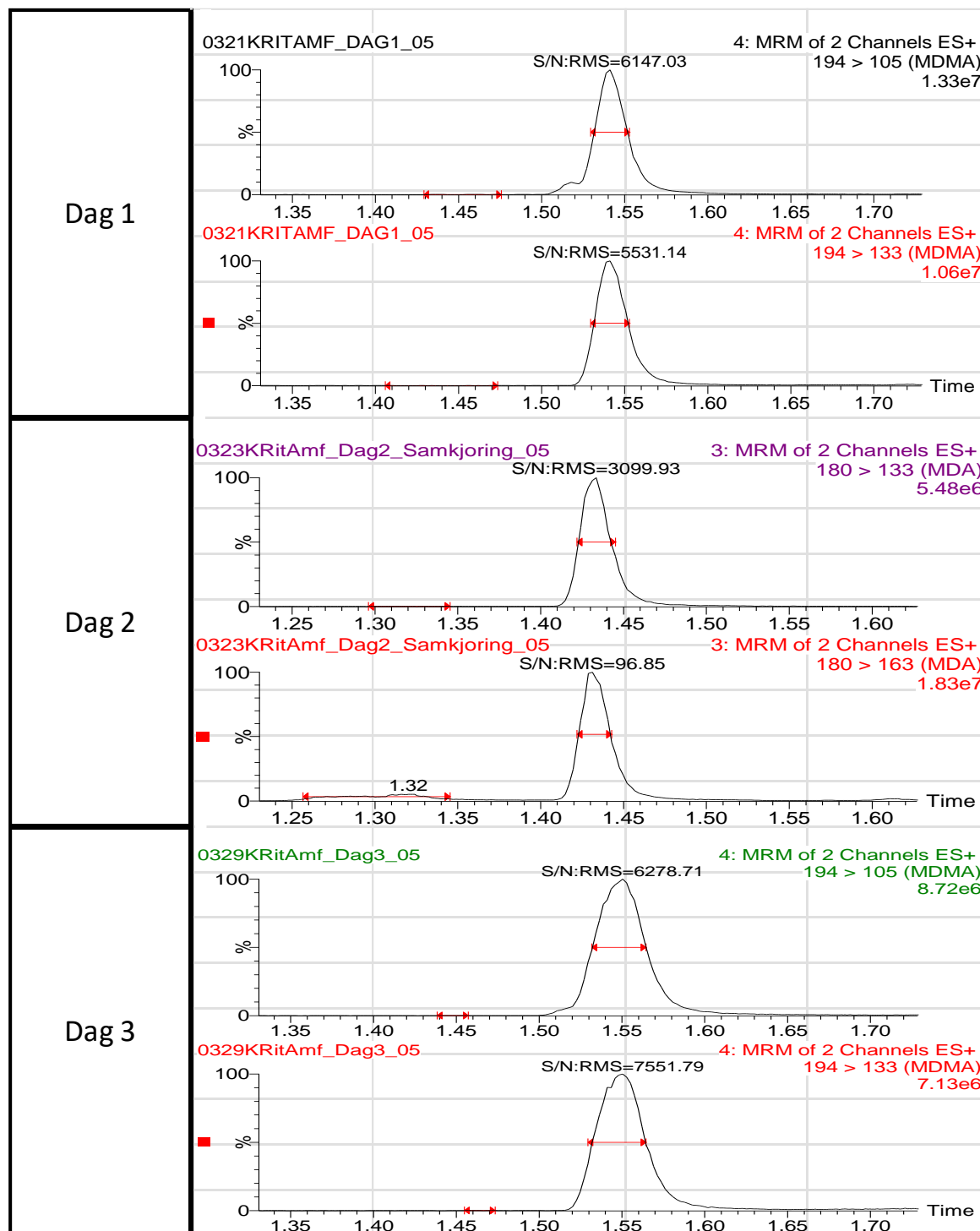
Metamfetamin:



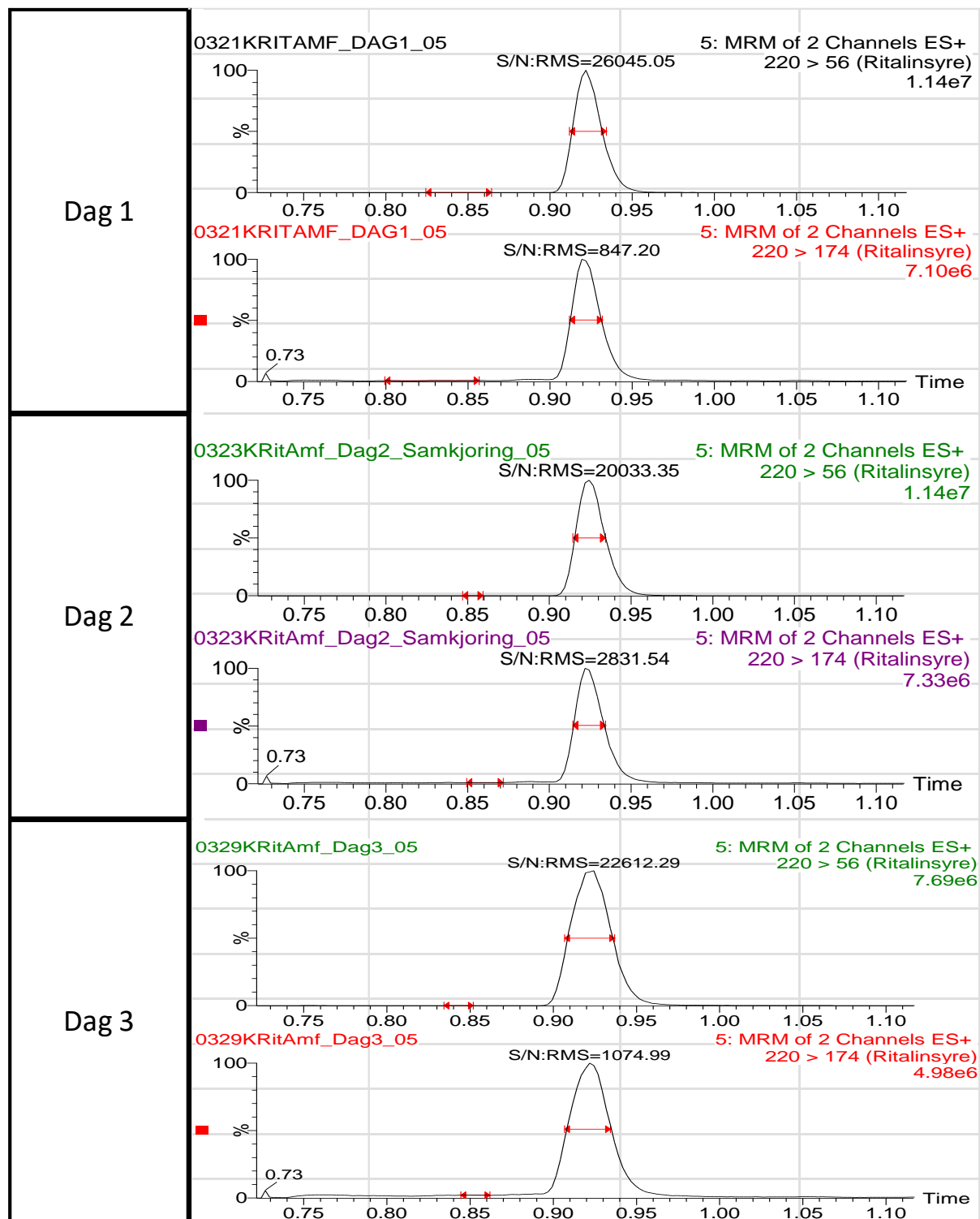
MDA:



MDMA:

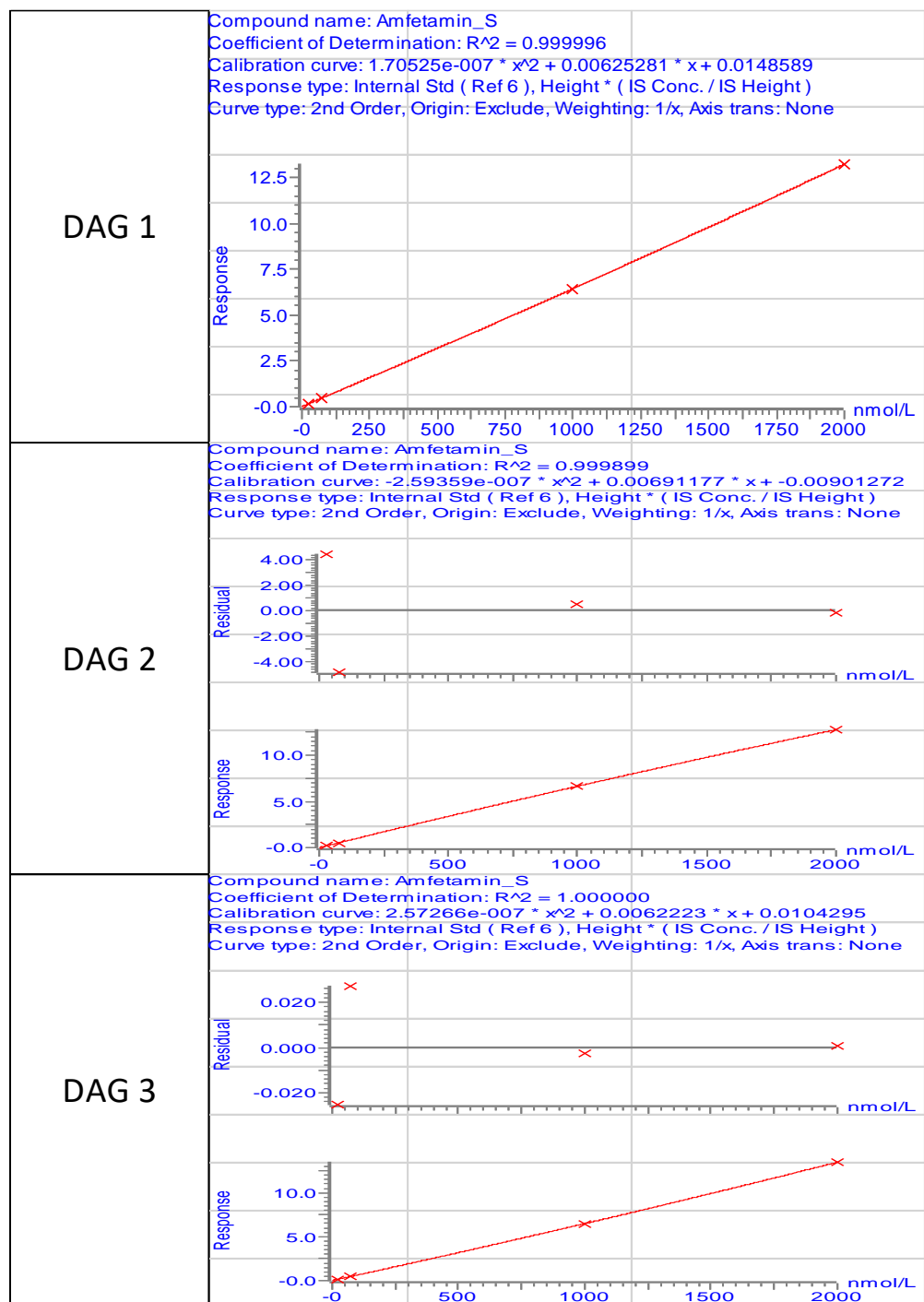


Ritalinsyre:

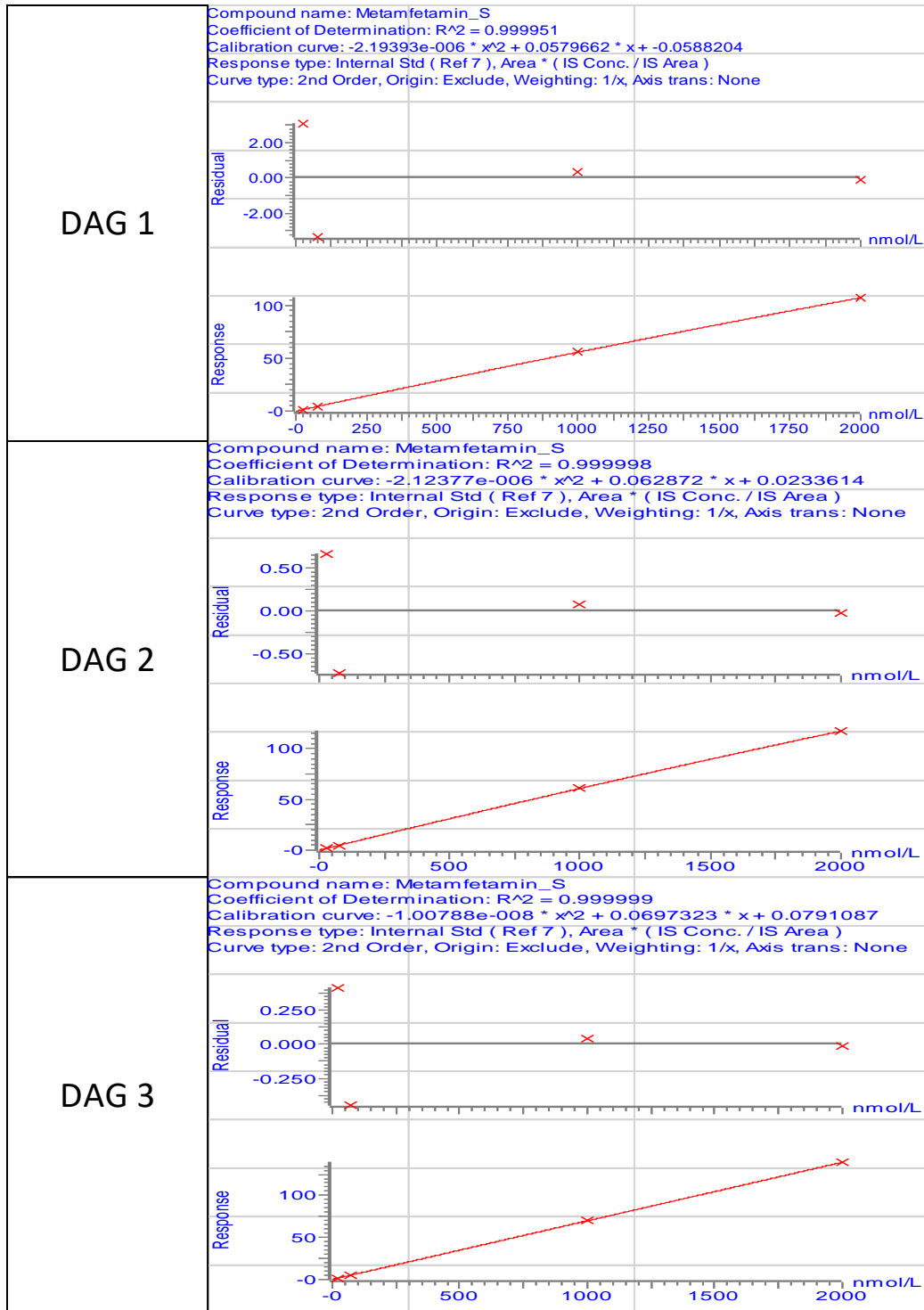


Vedlegg B: Standardkurver for alle tre analysedagene

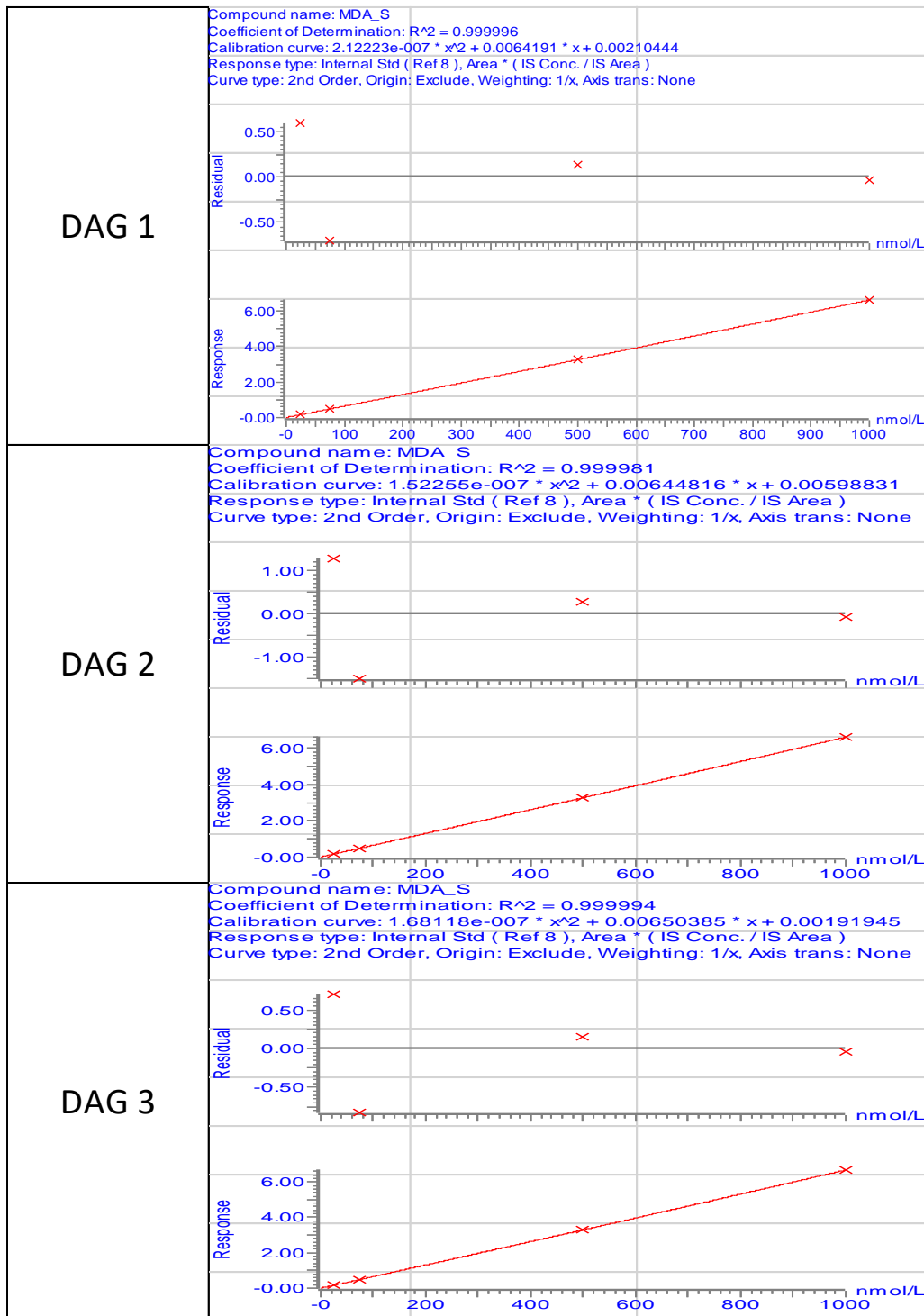
Amfetamin:



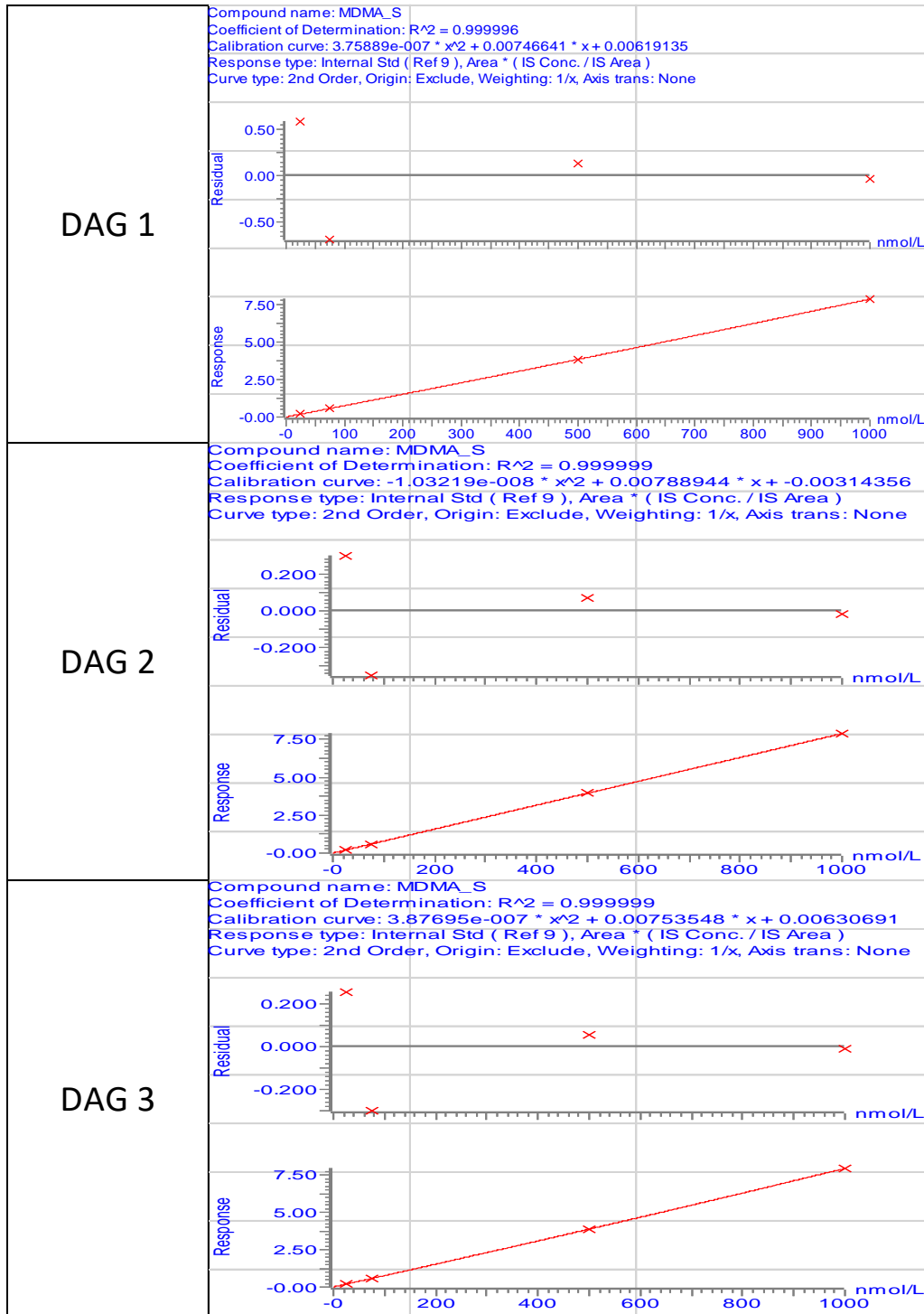
Metamfetamin:



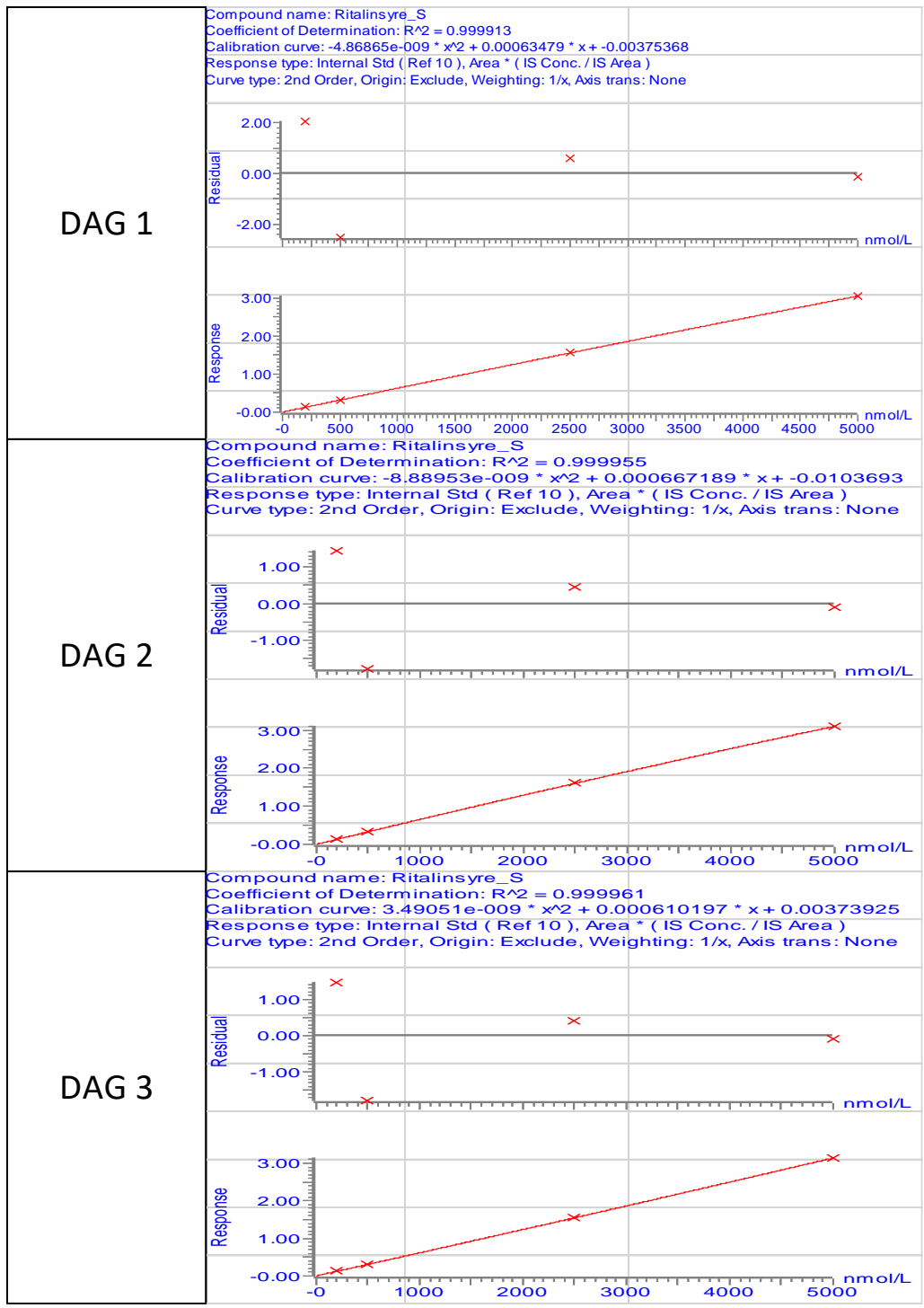
MDA:



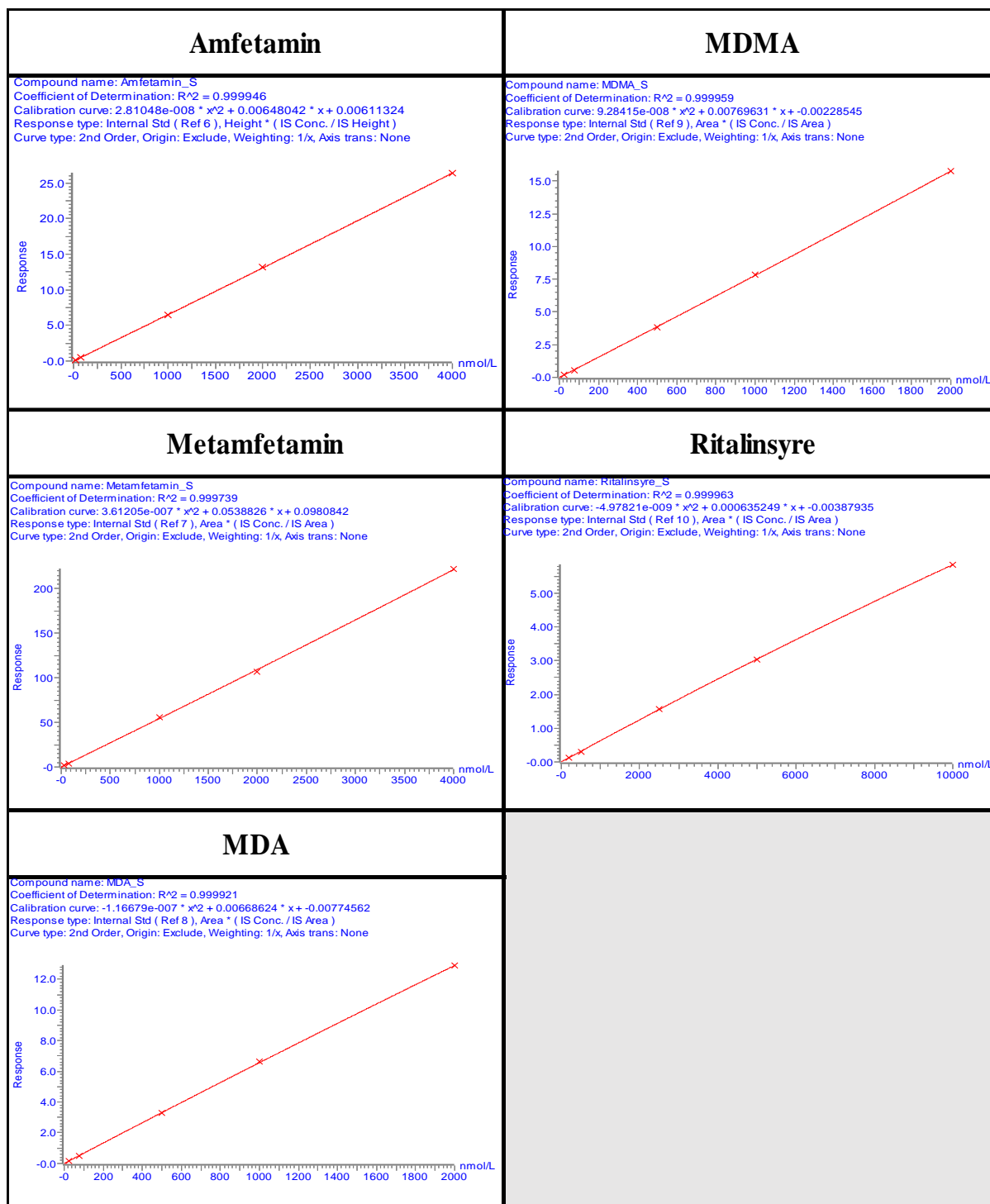
MDMA:



Ritalinsyre:



Vedlegg C: Standardkurver for standardrekker med Høy Std.



Vedlegg D: Beregningstabeller av matrikseffekter med IS-korrigering

Amfetamin	RATIO			RATIO		
	QC1	Kons. (nM)		QC3	Kons. (nM)	
	Amfetamin	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks	Amfetamin	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks
	Parallell1	0,702	0,686	Parallell1	24,763	25,823
	Parallell2	0,699	0,821	Parallell2	25,057	25,796
	Parallell3	0,697	0,69	Parallell3	25,222	24,866
	Parallell4		0,694	Parallell4		24,902
	Parallell5		0,7	Parallell5		24,656
	Parallell6		0,705	Parallell6		25,494
	Gjennomsnitt	0,6993	0,7160	Gjennomsnitt	25,0140	25,2562
	STDAV	0,0025	0,0519	STDAV	0,2325	0,5113
	% CV	0,4	7,2	% CV	0,9	2,0
	ME (%)	102		ME (%)	101	
	Metamfetamin	RATIO			RATIO	
QC1		Kons. (nM)		QC3	Kons. (nM)	
Metamfetamin		Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks	Metamfetamin	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks
Parallell1		7,383	6,986	Parallell1	259,441	251,078
Parallell2		7,424	8,351	Parallell2	255,424	255,47
Parallell3		7,24	7,148	Parallell3	257,841	259,991
Parallell4			7,175	Parallell4		259,983
Parallell5			7,256	Parallell5		254,885
Parallell6			6,905	Parallell6		256,869
Gjennomsnitt		7,3490	7,3035	Gjennomsnitt	258	256
STDAV		0,0966	0,5291	STDAV	2,0	3,4
% CV		1,3	7,2	% CV	0,8	1,3
ME (%)		99		ME (%)	100	
MDA		RATIO			RATIO	
	QC1	Kons. (nM)		QC3	Kons. (nM)	
	MDA	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks	MDA	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks
	Parallell1	0,671	0,656	Parallell1	13,186	13,531
	Parallell2	0,692	0,777	Parallell2	13,39	13,527
	Parallell3	0,679	0,67	Parallell3	13,035	13,192
	Parallell4		0,685	Parallell4		13,538
	Parallell5		0,677	Parallell5		13,316
	Parallell6		0,695	Parallell6		13,498
	Gjennomsnitt	0,6807	0,6933	Gjennomsnitt	13,2037	13,4337
	STDAV	0,0106	0,0431	STDAV	0,1782	0,1452
	% CV	1,6	6,2	% CV	1,3	1,1
	ME (%)	102		ME (%)	102	
	MDMA	RATIO			RATIO	
QC1		Kons. (nM)		QC3	Kons. (nM)	
MDMA		Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks	MDMA	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks
Parallell1		0,852	0,828	Parallell1	17,072	17,157
Parallell2		0,858	0,999	Parallell2	16,948	16,902
Parallell3		0,858	0,836	Parallell3	16,938	16,813
Parallell4			0,874	Parallell4		16,979
Parallell5			0,854	Parallell5		16,662
Parallell6			0,863	Parallell6		16,92
Gjennomsnitt		0,8560	0,8757	Gjennomsnitt	16,99	16,91
STDAV		0,0035	0,0628	STDAV	0,07	0,17
% CV		0,4	7,2	% CV	0,4	1,0
ME (%)		102		ME (%)	100	
Ritalinsyre		RATIO			RATIO	
	QC1	Kons. (nM)		QC3	Kons. (nM)	
	Ritalinsyre	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks	Ritalinsyre	Sett 1 u/matriks	Sett 2 m/matriks
	Parallell1	0,511	0,471	Parallell1	6,117	6,197
	Parallell2	0,508	0,565	Parallell2	6,168	6,151
	Parallell3	0,495	0,483	Parallell3	6,104	6,007
	Parallell4		0,493	Parallell4		5,973
	Parallell5		0,485	Parallell5		6,105
	Parallell6		0,496	Parallell6		6,196
	Gjennomsnitt	0,5047	0,4988	Gjennomsnitt	6,1297	6,1048
	STDAV	0,0085	0,0336	STDAV	0,0338	0,0958
	% CV	1,7	6,7	% CV	0,6	1,6
	ME (%)	99		ME (%)	100	

Vedlegg E: Utrekningstabeller av reproduserbarhet og nøyaktighet

Amfetamin:

Amfetamin	QC1 (nmol/l)	QC2 (nmol/l)	QC3 (nmol/L)
Dag1	39,6	207	1443
Dag2	39,2	193	1476
Dag3	40,5	210	1448,7
Gjennomsnitt	40	203	1456
SD	0,67	8,83	17,60
%CV	1,7	4,3	1,2
Teoretisk verdi	40	200	1500
Nøyaktighet (%)	99,4	101,7	97,1
Nøyaktighet (% avvik)	-0,6	1,6	-2,9

Metamfetamin:

Metamfetamin	QC1 (nmol/l)	QC2 (nmol/l)	QC3 (nmol/L)
Dag1	39,7	197	1455
Dag2	38,9	189	1425
Dag3	40,6	201,4	1442,3
Gjennomsnitt	40	196	1441
SD	0,85	6,07	15,40
%CV	2,1	3,1	1,1
Teoretisk verdi	40	200	1500
Nøyaktighet (%)	99,3	98,0	96,0
Nøyaktighet (% avvik)	-0,7	-2,0	-4,0

MDA:

MDA	QC1 (nmol/l)	QC2 (nmol/l)	QC3 (nmol/L)
Dag1	38,8	150	770
Dag2	38,7	147	780
Dag3	40	150,7	757,9
Gjennomsnitt	39	149	769
SD	0,72	2,17	10,94
%CV	1,8	1,5	1,4
Teoretisk verdi	40	150	800
Nøyaktighet (%)	97,9	99,4	96,2
Nøyaktighet (% avvik)	-2,1	-0,6	-3,8

MDMA:

MDMA	QC1 (nmol/l)	QC2 (nmol/l)	QC3 (nmol/L)
Dag1	42,7	165	824
Dag2	42	154	812
Dag3	43,5	163,7	811,4
Gjennomsnitt	43	161	816
SD	0,75	5,93	7,33
%CV	1,8	3,7	0,9
Teoretisk verdi	44	165	863
Nøyaktighet (%)	97,1	97,6	94,5
Nøyaktighet (% avvik)	-2,9	-2,4	-5,5

Ritalinsyre:

Ritalinsyre	QC1 (nmol/l)	QC2 (nmol/l)	QC3 (nmol/L)
Dag1	294	753	3847
Dag2	294	734	3797
Dag3	304,6	765,2	3776,4
Gjennomsnitt	298	751	3807
SD	5,90	15,91	36,49
%CV	2,0	2,1	1,0
Teoretisk verdi	300	750	4000
Nøyaktighet (%)	99,3	100,1	95,2
Nøyaktighet (% avvik)	-0,7	0,1	-4,8

Vedlegg F: Rådata fra instrumentsammenligning

Amfetamin:

	Nr.	Amfetamin			
		Prøve ID	Xevo TQ-XS(nmol/l)	Xevo TQ-S (nmol/l)	Avvik (%)
DAG1	1	AMF_1	596	605	-1,4
	2	AMF_2	667	694	-3,8
	3	AMF_3	377	390	-3,3
	4	AMF_4	605	603	0,2
	5	AMF_5	628	657	-4,4
	6	AMF_6	592	601	-1,6
	7	AMF_7	483	492	-1,7
	8	SPIKET1	26,5	28,2	-6,2
	9	SPIKET3	41,2	43,3	-4,8
	10	SPIKET5	60,8	66,0	-7,9
	11	SPIKET7	81,6	84,7	-3,7
	12	SPIKET9	104	107	-3,4
	13	SPIKET11	121	126	-3,5
	14	SPIKET13	144	147	-2,0
	15	SPIKET15	205	213	-3,7
	16	SPIKET17	305	327	-6,9
	17	SPIKET19	401	421	-4,7
DAG2	18	SPIKET2	28,8	29,7	-3,0
	19	SPIKET6	58,3	62,9	-7,3
	20	SPIKET10	94,9	98,7	-3,9
	21	SPIKET14	136,6	140,3	-2,6
	22	SPIKET18	288,5	301,3	-4,2
	23	SPIKET22	477,8	474,4	0,7
	24	SPIKET24	559,9	593,9	-5,7
	25	SPIKET26	1008,1	1004,2	0,4
	26	SPIKET28	1450,8	1381,1	5,0
	27	SPIKET30	1707,2	1875,6	-9,0
	28	JH267_LOW	164,9	170,4	-3,2
	29	JH267_HIGH	998,2	999,3	-0,1
	30	RIT_5	540,9	532,8	1,5
	31	AMF_8	645,9	637,4	1,3
	32	AMF_9	616,2	629,7	-2,1
	33	AMF_10	1108,3	1141,7	-2,9
	34	AMF_11	385,1	361,9	6,4
	35	AMF_12	429,2	425	1,0
	36	AMF_13	470,4	498,3	-5,6
	37	AMF_14	72,5	73	-0,7
	38	AMF_15	33,1	35	-5,4
	39	AMF_16	500,4	492,5	1,6
	40	AMF_17	500,9	504,3	-0,7
	41	AMF_18	721,9	716,8	0,7
DAG3	42	SPIKET4	41,5	40,1	3,5
	43	SPIKET8	80,7	80,1	0,7
	44	SPIKET12	118,3	116	2,0
	45	SPIKET16	203,2	198,2	2,5
	46	SPIKET20	393,9	391,3	0,7
	47	SPIKET21	497	481,2	3,3
	48	SPIKET23	603,2	548,5	10,0
	49	SPIKET25	896,6	868,6	3,2
	50	SPIKET27	1427,9	1418,2	0,7
	51	SPIKET29	1675,2	1646,4	1,7
	52	AMF_19	989,4	973,3	1,7
	53	AMF_20	649,5	621,1	4,6
	54	AMF_21	693,4	675,3	2,7
	55	AMF_22	89	88,3	0,8
	56	AMF_23	318,6	315,2	1,1
	57	AMF_24	426,6	416,3	2,5
58	AMF_25	459,7	446,4	3,0	
59	AMF_26	174,8	166,8	4,8	
60	AMF_27	408,6	384,3	6,3	
61	AMF_28	377,6	366,9	2,9	
62	AMF_29	1129,6	1107,9	2,0	

Metamfetamin:

	Nr.	Metamfetamin			
		Prøve ID	Xevo TQ- XS(µmol/l)	Xevo TQ-S (µmol/l)	Avvik (%)
DAG1	1	SPIKET1	29,6	27,3	8,4
	2	SPIKET3	41,4	41,7	-0,8
	3	SPIKET5	61,3	57,9	5,8
	4	SPIKET7	82,3	76,7	7,2
	5	SPIKET9	101	96,7	4,9
	6	SPIKET11	120	119	0,6
	7	SPIKET13	144	138	4,9
	8	SPIKET15	200	191	4,8
	9	SPIKET17	300	287	4,8
	10	SPIKET19	404	387	4,3
DAG2	11	SPIKET2	28,4	29	-2,1
	12	SPIKET6	60	58,9	1,9
	13	SPIKET10	97,7	95,4	2,4
	14	SPIKET14	138,4	137,9	0,4
	15	SPIKET18	298,1	298,3	-0,1
	16	SPIKET22	488,3	477,2	2,3
	17	SPIKET24	582,9	566,2	2,9
	18	SPIKET26	1015,7	1020,1	-0,4
	19	SPIKET28	1447,1	1459,7	-0,9
	20	SPIKET30	1791,1	1775,3	0,9
	21	JH267_LOW	155,9	156,5	-0,4
	22	JH267_HIGH	923,4	933,4	-1,1
DAG3	23	SPIKET4	40,9	41,4	-1,2
	24	SPIKET8	77,9	85,5	-8,9
	25	SPIKET12	115,5	122	-5,3
	26	SPIKET16	202,3	218,8	-7,5
	27	SPIKET20	394,8	414,9	-4,8
	28	SPIKET21	486,8	510,2	-4,6
	29	SPIKET23	566	627,7	-9,8
	30	SPIKET25	1057,1	1089,2	-2,9
	31	SPIKET27	1433,5	1400,7	2,3
	32	SPIKET29	1717	1658,3	3,5

MDA:

	Nr.	MDA			
		Prøve ID	Xevo TQ- XS(nmol/l)	Xevo TQ-S (nmol/l)	Avvik (%)
DAG1	1	SPIKET1	26,9	26,6	1,0
	2	SPIKET3	40,0	37,8	5,7
	3	SPIKET5	58,4	58,2	0,3
	4	SPIKET7	78,0	76,8	1,6
	5	SPIKET9	97,2	98,4	-1,2
	6	SPIKET11	114	116	-1,4
	7	SPIKET13	102	104	-1,2
	8	SPIKET15	145	144	1,2
	9	SPIKET17	216	213	1,5
	10	SPIKET19	290	289	0,3
	11	MDA_MDMA	38,6	36,3	6,2
DAG2	12	SPIKET2	26,7	30,1	-11,3
	13	SPIKET6	58	61,4	-5,5
	14	SPIKET10	96,2	96	0,2
	15	SPIKET14	102,8	105,7	-2,7
	16	SPIKET18	226,8	235,5	-3,7
	17	SPIKET22	364,5	357,1	2,1
	18	SPIKET24	425,8	414,3	2,8
	19	SPIKET26	535,7	552,1	-3,0
	20	SPIKET28	752,9	763,8	-1,4
	21	SPIKET30	896,3	866,9	3,4
	22	JH267_LOW	131,4	131	0,3
	23	JH267_HIGH	527,2	545,6	-3,4
DAG3	24	SPIKET4	38,3	40	-4,3
	25	SPIKET8	76	78,3	-2,9
	26	SPIKET12	109,4	111,9	-2,2
	27	SPIKET16	143,2	146,8	-2,5
	28	SPIKET20	279,6	293,6	-4,8
	29	SPIKET21	349,7	358,6	-2,5
	30	SPIKET23	418,7	434,9	-3,7
	31	SPIKET25	461,6	478,2	-3,5
	32	SPIKET27	733,6	730,7	0,4
	33	SPIKET29	886,4	888,2	-0,2

MDMA:

	Nr.	MDMA			
		Prøve ID	Xevo TQ- XS(nmol/l)	Xevo TQ-S (nmol/l)	Avvik (%)
DAG1	1	SPIKET1	29,5	30,1	-1,9
	2	SPIKET3	44,2	43,9	0,6
	3	SPIKET5	63,9	62,2	2,7
	4	SPIKET7	86,2	85,9	0,3
	5	SPIKET9	107	104	3,2
	6	SPIKET11	125	125	0,0
	7	SPIKET13	116	113	2,9
	8	SPIKET15	158	160	-1,4
	9	SPIKET17	242	235	2,8
	10	SPIKET19	326	314	3,8
	11	MDA_MDMA	316	305	3,5
DAG2	12	SPIKET2	30,9	31,8	-2,8
	13	SPIKET6	62,7	64,5	-2,8
	14	SPIKET10	103,8	106,3	-2,4
	15	SPIKET14	112,9	109,2	3,4
	16	SPIKET18	241,7	245,9	-1,7
	17	SPIKET22	390,8	391,1	-0,1
	18	SPIKET24	465,7	477,4	-2,5
	19	SPIKET26	582,7	585,6	-0,5
	20	SPIKET28	823	841,1	-2,2
	21	SPIKET30	995,2	1005	-1,0
	22	JH267_LOW	119,4	122,9	-2,8
	23	JH267_HIGH	711,4	720	-1,2
DAG3	24	SPIKET4	42,2	43,5	-3,0
	25	SPIKET8	86,8	83,9	3,5
	26	SPIKET12	124,9	125	-0,1
	27	SPIKET16	160,4	163,5	-1,9
	28	SPIKET20	316,3	316,6	-0,1
	29	SPIKET21	397,5	398,3	-0,2
	30	SPIKET23	470,1	458,7	2,5
	31	SPIKET25	601,4	591,4	1,7
	32	SPIKET27	817	834,6	-2,1
	33	SPIKET29	978	959,2	2,0

Ritalinsyre:

	Nr.	Ritalinsyre			
		Prøve ID	Xevo TQ-XS(nmol/l)	Xevo TQ-S (nmol/l)	Avvik (%)
DAG1	1	AMF_5	540	537	0,7
	2	RIT_1	954	923	3,3
	3	RIT_2	3262	3303	-1,2
	4	RIT_3	594	604	-1,5
	5	R221_PST1B	2337	2405	-2,8
	6	R221_PST1A	820	822	-0,2
	7	R218_PST1B	1379	1375	0,3
	8	SPIKET1	206	203	1,8
	9	SPIKET3	299	298	0,5
	10	SPIKET5	444	446	-0,3
	11	SPIKET7	594	588	1,0
	12	SPIKET9	747	742	0,7
	13	SPIKET11	871	906	-3,8
	14	SPIKET13	518	528	-1,8
	15	SPIKET15	739	735	0,6
	16	SPIKET17	1114	1139	-2,2
	17	SPIKET19	1503	1472	2,1
DAG2	18	SPIKET2	212,1	209,3	1,3
	19	SPIKET6	434,9	433,7	0,3
	20	SPIKET10	723,6	711,2	1,7
	21	SPIKET14	513	526,6	-2,6
	22	SPIKET18	1109,6	1113,6	-0,4
	23	SPIKET22	1843	1808,3	1,9
	24	SPIKET24	2176,3	2132,2	2,1
	25	SPIKET26	2769,3	2785,8	-0,6
	26	SPIKET28	3861,8	3902,4	-1,0
	27	SPIKET30	4573	4653,5	-1,7
	28	RIT_4	2096,6	2127	-1,4
	29	RIT_5	826,4	825,2	0,1
	30	RIT_6	2613,8	2701,4	-3,2
	31	R218_PST1A	2253,6	2224,8	1,3
	32	R218_PST1B	1898,3	1869	1,6
	33	AMF_16	4767,6	4994,6	-4,5
DAG3	34	SPIKET4	297,9	307,5	-3,1
	35	SPIKET8	597,8	632,1	-5,4
	36	SPIKET12	882,7	908,1	-2,8
	37	SPIKET16	757,5	786,6	-3,7
	38	SPIKET20	1482,5	1507,8	-1,7
	39	SPIKET21	1857,3	1857,3	0,0
	40	SPIKET23	2188,9	2204,9	-0,7
	41	SPIKET25	2800,2	2951,6	-5,1
	42	SPIKET27	3739,9	3860,6	-3,1
	43	SPIKET29	4606,2	4573,1	0,7
	44	RIT_7	2289,5	2363,5	-3,1
	45	RIT_8	782,7	819,4	-4,5
	46	RIT_9	1698,2	1689,4	0,5
	47	RIT_10	416,8	427,1	-2,4
	48	R215_PST1A	701,2	724,2	-3,2
	49	R212_PST1B	595,8	605,2	-1,6
	50	R212_PST1A	564,1	591,2	-4,6

Vedlegg G: Tabell for utregning av robusthet

		Amfetamin				MDA			
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag1	QC2	207	1039766	793385	QC2	150	644881	665586	
	QCD	208	1076905	807538	QCD	149	647288	671440	
	Avvik %	0,5	3,6	1,8	Avvik %	-0,5	0,4	0,9	
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag2	QC2	193	1077248	815752	QC2	147	677079	709274	
	QCD	191	1099379	841834	QCD	150	697074	715431	
	Avvik %	-1,0	2,1	3,2	Avvik %	2,0	3,0	0,9	
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag3	QC2	210	1135084	850988	QC2	150,7	664015	673353	
	QCD	204,5	1151532	872461	QCD	150,6	676473	686489	
	Avvik %	-2,6	1,4	2,5	Avvik %	-0,1	1,9	2,0	
		Metamfetamin				MDMA			
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag1	QC2	197	723674	64184	QC2	165	1455842	1164270	
	QCD	207	725201	61203	QCD	164	1483577	1193114	
	Avvik %	5,1	0,2	-4,6	Avvik %	-0,6	1,9	2,5	
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag2	QC2	189	714715	60301	QC2	154	1500469	1235909	
	QCD	191	720933	60212	QCD	158	1559142	1252998	
	Avvik %	1,0	0,9	-0,1	Avvik %	2,5	3,9	1,4	
Name	ID	Kons	Area	IS area	ID	Kons	Area	IS area	
Dag3	QC2	201,4	723378	51219	QC2	163,7	1460588	1168198	
	QCD	201,1	715059	50703	QCD	163,6	1497214	1198310	
	Avvik %	-0,1	-1,2	-1,0	Avvik %	-0,1	2,5	2,6	
		Ritalinsyre							
Name	ID	Kons	Area	IS area					
Dag1	QC2	753	785454	1665230					
	QCD	753	785624	1665373					
	Avvik %	0,0	0,0	0,0					
Name	ID	Kons	Area	IS area					
Dag2	QC2	734	828670	1746805					
	QCD	726	831852	1771419					
	Avvik %	-1,0	0,4	1,4					
Name	ID	Kons	Area	IS area					
Dag3	QC2	765,2	707966	1497660					
	QCD	756,5	674662	1443573					
	Avvik %	-1,1	-4,7	-3,6					

Vedlegg H: Rådata IS-areal

Amfetamin dag 1:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Amfetamin- ¹³ C6	1	0321KRITAMF_DAG1_05	Std1	802568		7,2
	2	0321KRITAMF_DAG1_06	Std2	800428	748369	7,0
	3	0321KRITAMF_DAG1_07	Std3	696309		-7,0
	4	0321KRITAMF_DAG1_08	Std4	592065		-20,9
	6	0321KRITAMF_DAG1_10	qc1RITAMF_S	821864		9,8
	7	0321KRITAMF_DAG1_11	qc2RITAMF_S	793385		6,0
	8	0321KRITAMF_DAG1_12	qc3RITAMF_S	672992		-10,1
	9	0321KRITAMF_DAG1_13	HOYSTD	465289		-37,8
	12	0321KRITAMF_DAG1_16	AMF_1	749545		0,2
	13	0321KRITAMF_DAG1_17	AMF_2	746159		-0,3
	14	0321KRITAMF_DAG1_18	AMF_3	755115		0,9
	15	0321KRITAMF_DAG1_19	AMF_4	727413		-2,8
	16	0321KRITAMF_DAG1_20	AMF_5	740317		-1,1
	17	0321KRITAMF_DAG1_21	AMF_6	787126		5,2
	18	0321KRITAMF_DAG1_22	AMF_7	758858		1,4
	19	0321KRITAMF_DAG1_23	RIT_1	849019		13,4
	20	0321KRITAMF_DAG1_24	RIT_2	813410		8,7
	21	0321KRITAMF_DAG1_25	RIT_3	841403		12,4
	22	0321KRITAMF_DAG1_26	R221_PST1B	789383		5,5
	23	0321KRITAMF_DAG1_27	R221_PST1A	782823		4,6
	24	0321KRITAMF_DAG1_28	R218_PST1B	790982		5,7
	25	0321KRITAMF_DAG1_29	SPIKET1	860644		15,0
	26	0321KRITAMF_DAG1_30	SPIKET3	831498		11,1
	27	0321KRITAMF_DAG1_31	SPIKET5	824689		10,2
	28	0321KRITAMF_DAG1_32	SPIKET7	834950		11,6
	29	0321KRITAMF_DAG1_33	SPIKET9	852864		14,0
	30	0321KRITAMF_DAG1_34	SPIKET11	836631		11,8
	31	0321KRITAMF_DAG1_35	SPIKET13	815042		8,9
	32	0321KRITAMF_DAG1_36	SPIKET15	801986		7,2
	33	0321KRITAMF_DAG1_37	SPIKET17	799390		6,8
	34	0321KRITAMF_DAG1_38	SPIKET19	799193		6,8
	35	0321KRITAMF_DAG1_39	MDA_MDMA	819859		9,6
	36	0321KRITAMF_DAG1_40	qcDRITAMF_S	807538		7,9

Amfetamin dag 2:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Amfetamin-¹³C6	1	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_05	Std1	792145		4,1
	2	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_06	Std2	811935	760659	6,7
	3	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_07	Std3	709383		-6,7
	4	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_08	Std4	620366		-18,4
	6	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_09	qc1RITAMF_S	816845		7,4
	7	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_10	qc2RITAMF_S	807725		6,2
	8	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_11	qc3RITAMF_S	815752		7,2
	12	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_13	SPIKET2	799922		5,2
	13	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_14	SPIKET6	806868		6,1
	14	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_15	SPIKET10	819915		7,8
	15	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_16	SPIKET14	782700		2,9
	16	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_17	SPIKET18	770783		1,3
	17	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_18	SPIKET22	772740		1,6
	18	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_19	SPIKET24	775959		2,0
	19	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_20	SPIKET26	735254		-3,3
	20	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_21	SPIKET28	683948		-10,1
	21	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_22	SPIKET30	641971		-15,6
	22	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_23	JH267_LOW	806486		6,0
	23	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_24	JH267_HIGH	601495		-20,9
	24	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_25	RIT_4	783876		3,1
	25	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_26	RIT_5	737463		-3,0
	26	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_27	RIT_6	704611		-7,4
	27	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_28	R218_PST1A	829714		9,1
	28	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_29	R218_PST1B	812161		6,8
	29	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_30	AMF_8	771667		1,4
	30	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_31	AMF_9	761670		0,1
	31	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_32	AMF_10	741492		-2,5
	32	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_33	AMF_11	781921		2,8
	33	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_34	AMF_12	733792		-3,5
	34	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_35	AMF_13	738568		-2,9
	35	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_36	AMF_14	824041		8,3
	36	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_37	AMF_15	830687		9,2
	37	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_38	AMF_16	791226		4,0
	38	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_39	AMF_17	776504		2,1
	39	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_40	AMF_18	730584		-4,0
	40	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_41	qcDRITAMF_S	841834		10,7

Amfetamin dag 3:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Amfetamin-¹³C6	1	0329KRitAmf_Dag3_05	Std1	857678		4,6
	2	0329KRitAmf_Dag3_06	Std2	861725	820028	5,1
	3	0329KRitAmf_Dag3_07	Std3	778332		-5,1
	4	0329KRitAmf_Dag3_08	Std4	664208		-19,0
	6	0329KRitAmf_Dag3_10	qc1RITAMF_S	867142		5,7
	7	0329KRitAmf_Dag3_11	qc2RITAMF_S	850988		3,8
	8	0329KRitAmf_Dag3_12	qc3RITAMF_S	750668		-8,5
	12	0329KRitAmf_Dag3_13	SPIKET4	794802		-3,1
	13	0329KRitAmf_Dag3_14	SPIKET8	773592		-5,7
	14	0329KRitAmf_Dag3_15	SPIKET12	790811		-3,6
	15	0329KRitAmf_Dag3_16	SPIKET16	759015		-7,4
	16	0329KRitAmf_Dag3_17	SPIKET20	757464		-7,6
	17	0329KRitAmf_Dag3_18	SPIKET21	750667		-8,5
	18	0329KRitAmf_Dag3_19	SPIKET23	755761		-7,8
	19	0329KRitAmf_Dag3_20	SPIKET25	767649		-6,4
	20	0329KRitAmf_Dag3_21	SPIKET27	680513		-17,0
	21	0329KRitAmf_Dag3_22	SPIKET29	639514		-22,0
	22	0329KRitAmf_Dag3_23	RIT_7	796083		-2,9
	23	0329KRitAmf_Dag3_24	RIT_8	884349		7,8
	24	0329KRitAmf_Dag3_25	RIT_9	916985		11,8
	25	0329KRitAmf_Dag3_26	RIT_10	883428		7,7
	26	0329KRitAmf_Dag3_27	R215_PST1A	822909		0,4
	27	0329KRitAmf_Dag3_28	R212_PST1B	800167		-2,4
	28	0329KRitAmf_Dag3_29	R212_PST1A	794457		-3,1
	29	0329KRitAmf_Dag3_30	AMF_19	769307		-6,2
	30	0329KRitAmf_Dag3_31	AMF_20	790571		-3,6
	31	0329KRitAmf_Dag3_32	AMF_21	788685		-3,8
	32	0329KRitAmf_Dag3_33	AMF_22	827393		0,9
	33	0329KRitAmf_Dag3_34	AMF_23	881616		7,5
	34	0329KRitAmf_Dag3_35	AMF_24	834111		1,7
	35	0329KRitAmf_Dag3_36	AMF_25	788726		-3,8
	36	0329KRitAmf_Dag3_37	AMF_26	800790		-2,3
	37	0329KRitAmf_Dag3_38	AMF_27	799322		-2,5
	38	0329KRitAmf_Dag3_39	AMF_28	742980		-9,4
	39	0329KRitAmf_Dag3_40	AMF_29	723017		-11,8
	40	0329KRitAmf_Dag3_41	qcDRITAMF_S	872461		6,4

Metamfetamin dag 1:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Metamfetamin-13C6	1	0321KRITAMF_DAG1_05	Std1	66635		5,5
	2	0321KRITAMF_DAG1_06	Std2	67078	63160	6,2
	3	0321KRITAMF_DAG1_07	Std3	59242		-6,2
	4	0321KRITAMF_DAG1_08	Std4	53806		-14,8
	6	0321KRITAMF_DAG1_10	qc1RITAMF_S	65455		3,6
	7	0321KRITAMF_DAG1_11	qc2RITAMF_S	64184		1,6
	8	0321KRITAMF_DAG1_12	qc3RITAMF_S	58592		-7,2
	9	0321KRITAMF_DAG1_13	HOYSTD	43683		-30,8
	12	0321KRITAMF_DAG1_16	AMF_1	64116		1,5
	13	0321KRITAMF_DAG1_17	AMF_2	58716		-7,0
	14	0321KRITAMF_DAG1_18	AMF_3	60212		-4,7
	15	0321KRITAMF_DAG1_19	AMF_4	58532		-7,3
	16	0321KRITAMF_DAG1_20	AMF_5	56855		-10,0
	17	0321KRITAMF_DAG1_21	AMF_6	63324		0,3
	18	0321KRITAMF_DAG1_22	AMF_7	58693		-7,1
	19	0321KRITAMF_DAG1_23	RIT_1	63815		1,0
	20	0321KRITAMF_DAG1_24	RIT_2	59792		-5,3
	21	0321KRITAMF_DAG1_25	RIT_3	58784		-6,9
	22	0321KRITAMF_DAG1_26	R221_PST1B	63348		0,3
	23	0321KRITAMF_DAG1_27	R221_PST1A	62518		-1,0
	24	0321KRITAMF_DAG1_28	R218_PST1B	62892		-0,4
	25	0321KRITAMF_DAG1_29	SPIKET1	63593		0,7
	26	0321KRITAMF_DAG1_30	SPIKET3	63833		1,1
	27	0321KRITAMF_DAG1_31	SPIKET5	61571		-2,5
	28	0321KRITAMF_DAG1_32	SPIKET7	62566		-0,9
	29	0321KRITAMF_DAG1_33	SPIKET9	64015		1,4
	30	0321KRITAMF_DAG1_34	SPIKET11	61944		-1,9
	31	0321KRITAMF_DAG1_35	SPIKET13	62255		-1,4
	32	0321KRITAMF_DAG1_36	SPIKET15	61230		-3,1
	33	0321KRITAMF_DAG1_37	SPIKET17	60665		-4,0
	34	0321KRITAMF_DAG1_38	SPIKET19	60993		-3,4
	35	0321KRITAMF_DAG1_39	MDA_MDMA	61158		-3,2
	36	0321KRITAMF_DAG1_40	qcDRITAMF_S	61203		-3,1

Metamfetamin dag 2:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Metamfetamin-13C6	1	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_05	Std1	57412		0,7
	2	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_06	Std2	58486	56987	2,6
	3	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_07	Std3	55488		-2,6
	4	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_08	Std4	50520		-11,3
	6	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_09	qc1RITAMF_S	58969		3,5
	7	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_10	qc2RITAMF_S	58637		2,9
	8	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_11	qc3RITAMF_S	60301		5,8
	12	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_13	SPIKET2	56371		-1,1
	13	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_14	SPIKET6	56315		-1,2
	14	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_15	SPIKET10	57951		1,7
	15	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_16	SPIKET14	56730		-0,5
	16	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_17	SPIKET18	55839		-2,0
	17	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_18	SPIKET22	56423		-1,0
	18	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_19	SPIKET24	57120		0,2
	19	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_20	SPIKET26	56225		-1,3
	20	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_21	SPIKET28	52589		-7,7
	21	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_22	SPIKET30	47572		-16,5
	22	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_23	JH267_LOW	56366		-1,1
	23	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_24	JH267_HIGH	42207		-25,9
	24	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_25	RIT_4	55049		-3,4
	25	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_26	RIT_5	55891		-1,9
	26	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_27	RIT_6	55984		-1,8
	27	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_28	R218_PST1A	59546		4,5
	28	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_29	R218_PST1B	61246		7,5
	29	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_30	AMF_8	50062		-12,2
	30	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_31	AMF_9	56654		-0,6
	31	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_32	AMF_10	59844		5,0
	32	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_33	AMF_11	55321		-2,9
	33	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_34	AMF_12	54340		-4,6
	34	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_35	AMF_13	49017		-14,0
	35	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_36	AMF_14	58674		3,0
	36	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_37	AMF_15	54647		-4,1
	37	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_38	AMF_16	54680		-4,0
	38	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_39	AMF_17	57341		0,6
	39	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_40	AMF_18	55005		-3,5
	40	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_41	qcDRITAMF_S	60212		5,7

Metamfetamin dag 3:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Metamfetamin-13C6	1	0329KRitAmf_Dag3_05	Std1	51453		2,5
	2	0329KRitAmf_Dag3_06	Std2	51271	50191	2,2
	3	0329KRitAmf_Dag3_07	Std3	49110		-2,2
	4	0329KRitAmf_Dag3_08	Std4	44823		-10,7
	6	0329KRitAmf_Dag3_10	qc1RITAMF_S	49981		-0,4
	7	0329KRitAmf_Dag3_11	qc2RITAMF_S	51219		2,0
	8	0329KRitAmf_Dag3_12	qc3RITAMF_S	48017		-4,3
	12	0329KRitAmf_Dag3_13	SPIKET4	44908		-10,5
	13	0329KRitAmf_Dag3_14	SPIKET8	44153		-12,0
	14	0329KRitAmf_Dag3_15	SPIKET12	45944		-8,5
	15	0329KRitAmf_Dag3_16	SPIKET16	43263		-13,8
	16	0329KRitAmf_Dag3_17	SPIKET20	44350		-11,6
	17	0329KRitAmf_Dag3_18	SPIKET21	45058		-10,2
	18	0329KRitAmf_Dag3_19	SPIKET23	46167		-8,0
	19	0329KRitAmf_Dag3_20	SPIKET25	47996		-4,4
	20	0329KRitAmf_Dag3_21	SPIKET27	43145		-14,0
	21	0329KRitAmf_Dag3_22	SPIKET29	41217		-17,9
	22	0329KRitAmf_Dag3_23	RIT_7	48862		-2,6
	23	0329KRitAmf_Dag3_24	RIT_8	50719		1,1
	24	0329KRitAmf_Dag3_25	RIT_9	50548		0,7
	25	0329KRitAmf_Dag3_26	RIT_10	51071		1,8
	26	0329KRitAmf_Dag3_27	R215_PST1A	51737		3,1
	27	0329KRitAmf_Dag3_28	R212_PST1B	51289		2,2
	28	0329KRitAmf_Dag3_29	R212_PST1A	51786		3,2
	29	0329KRitAmf_Dag3_30	AMF_19	48416		-3,5
	30	0329KRitAmf_Dag3_31	AMF_20	49843		-0,7
	31	0329KRitAmf_Dag3_32	AMF_21	49595		-1,2
	32	0329KRitAmf_Dag3_33	AMF_22	46805		-6,7
	33	0329KRitAmf_Dag3_34	AMF_23	51402		2,4
	34	0329KRitAmf_Dag3_35	AMF_24	49328		-1,7
	35	0329KRitAmf_Dag3_36	AMF_25	47645		-5,1
	36	0329KRitAmf_Dag3_37	AMF_26	49558		-1,3
	37	0329KRitAmf_Dag3_38	AMF_27	50055		-0,3
	38	0329KRitAmf_Dag3_39	AMF_28	43522		-13,3
	39	0329KRitAmf_Dag3_40	AMF_29	49254		-1,9
	40	0329KRitAmf_Dag3_41	qcDRITAMF_S	50703		1,0

MDA dag 1:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
MDA-13C6	1	0321KRITAMF_DAG1_05	Std1	670522		3,8
	2	0321KRITAMF_DAG1_06	Std2	667368	645913	3,3
	3	0321KRITAMF_DAG1_07	Std3	624457		-3,3
	4	0321KRITAMF_DAG1_08	Std4	555936		-13,9
	6	0321KRITAMF_DAG1_10	qc1RITAMF_S	695280		7,6
	7	0321KRITAMF_DAG1_11	qc2RITAMF_S	665586		3,0
	8	0321KRITAMF_DAG1_12	qc3RITAMF_S	614709		-4,8
	9	0321KRITAMF_DAG1_13	HOYSTD	481953		-25,4
	12	0321KRITAMF_DAG1_16	AMF_1	679640		5,2
	13	0321KRITAMF_DAG1_17	AMF_2	643504		-0,4
	14	0321KRITAMF_DAG1_18	AMF_3	683008		5,7
	15	0321KRITAMF_DAG1_19	AMF_4	717764		11,1
	16	0321KRITAMF_DAG1_20	AMF_5	710794		10,0
	17	0321KRITAMF_DAG1_21	AMF_6	728135		12,7
	18	0321KRITAMF_DAG1_22	AMF_7	685068		6,1
	19	0321KRITAMF_DAG1_23	RIT_1	731562		13,3
	20	0321KRITAMF_DAG1_24	RIT_2	724624		12,2
	21	0321KRITAMF_DAG1_25	RIT_3	717490		11,1
	22	0321KRITAMF_DAG1_26	R221_PST1B	669397		3,6
	23	0321KRITAMF_DAG1_27	R221_PST1A	666709		3,2
	24	0321KRITAMF_DAG1_28	R218_PST1B	669815		3,7
	25	0321KRITAMF_DAG1_29	SPIKET1	715266		10,7
	26	0321KRITAMF_DAG1_30	SPIKET3	704850		9,1
	27	0321KRITAMF_DAG1_31	SPIKET5	693905		7,4
	28	0321KRITAMF_DAG1_32	SPIKET7	695052		7,6
	29	0321KRITAMF_DAG1_33	SPIKET9	709260		9,8
	30	0321KRITAMF_DAG1_34	SPIKET11	702811		8,8
	31	0321KRITAMF_DAG1_35	SPIKET13	696864		7,9
	32	0321KRITAMF_DAG1_36	SPIKET15	672495		4,1
	33	0321KRITAMF_DAG1_37	SPIKET17	676645		4,8
	34	0321KRITAMF_DAG1_38	SPIKET19	660500		2,3
	35	0321KRITAMF_DAG1_39	MDA_MDMA	674103		4,4
	36	0321KRITAMF_DAG1_40	qcDRITAMF_S	671440		4,0

MDA dag 2:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)	
MDA-13C6	1	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_05	Std1	679796		3,5	
	2	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_06	Std2	677877	656937	3,2	
	3	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_07	Std3	635997		-3,2	
	4	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_08	Std4	588116		-10,5	
	6	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_09	qc1RITAMF_S	711428		8,3	
	7	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_10	qc2RITAMF_S	700932		6,7	
	8	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_11	qc3RITAMF_S	709274		8,0	
	12	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_13	SPIKET2	681299		3,7	
	13	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_14	SPIKET6	675262		2,8	
	14	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_15	SPIKET10	694377		5,7	
	15	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_16	SPIKET14	673411		2,5	
	16	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_17	SPIKET18	653399		-0,5	
	17	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_18	SPIKET22	654458		-0,4	
	18	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_19	SPIKET24	665379		1,3	
	19	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_20	SPIKET26	644510		-1,9	
	20	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_21	SPIKET28	617367		-6,0	
	21	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_22	SPIKET30	584817		-11,0	
	22	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_23	JH267_LOW	690014		5,0	
	23	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_24	JH267_HIGH	601787		-8,4	
	24	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_25	RIT_4	712772		8,5	
	25	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_26	RIT_5	661656		0,7	
	26	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_27	RIT_6	671815		2,3	
	27	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_28	R218_PST1A	678891		3,3	
	28	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_29	R218_PST1B	676780		3,0	
	29	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_30	AMF_8	708221		7,8	
	30	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_31	AMF_9	716904		9,1	
	31	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_32	AMF_10	711329		8,3	
		32	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_33	AMF_11	707883		7,8
		33	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_34	AMF_12	709934		8,1
		34	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_35	AMF_13	702865		7,0
		35	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_36	AMF_14	748261		13,9
		36	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_37	AMF_15	727591		10,8
		37	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_38	AMF_16	732803		11,5
		38	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_39	AMF_17	728890		11,0
		39	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_40	AMF_18	697977		6,2
		40	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_41	qcDRITAMF_S	715431		8,9

MDA dag 3:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)	
MDA-13C6	1	0329KRitAmf_Dag3_05	Std1	692998		7,5	
	2	0329KRitAmf_Dag3_06	Std2	670619	644669	4,0	
	3	0329KRitAmf_Dag3_07	Std3	618719		-4,0	
	4	0329KRitAmf_Dag3_08	Std4	536664		-16,8	
	6	0329KRitAmf_Dag3_10	qc1RITAMF_S	684301		6,1	
	7	0329KRitAmf_Dag3_11	qc2RITAMF_S	673353		4,4	
	8	0329KRitAmf_Dag3_12	qc3RITAMF_S	598422		-7,2	
	12	0329KRitAmf_Dag3_13	SPIKET4	633812		-1,7	
	13	0329KRitAmf_Dag3_14	SPIKET8	632598		-1,9	
	14	0329KRitAmf_Dag3_15	SPIKET12	633986		-1,7	
	15	0329KRitAmf_Dag3_16	SPIKET16	603079		-6,5	
	16	0329KRitAmf_Dag3_17	SPIKET20	591326		-8,3	
	17	0329KRitAmf_Dag3_18	SPIKET21	580321		-10,0	
	18	0329KRitAmf_Dag3_19	SPIKET23	588739		-8,7	
	19	0329KRitAmf_Dag3_20	SPIKET25	524127		-18,7	
	20	0329KRitAmf_Dag3_21	SPIKET27	539329		-16,3	
	21	0329KRitAmf_Dag3_22	SPIKET29	495089		-23,2	
	22	0329KRitAmf_Dag3_23	RIT_7	578428		-10,3	
	23	0329KRitAmf_Dag3_24	RIT_8	725622		12,6	
	24	0329KRitAmf_Dag3_25	RIT_9	725161		12,5	
	25	0329KRitAmf_Dag3_26	RIT_10	717654		11,3	
	26	0329KRitAmf_Dag3_27	R215_PST1A	650043		0,8	
	27	0329KRitAmf_Dag3_28	R212_PST1B	624678		-3,1	
	28	0329KRitAmf_Dag3_29	R212_PST1A	629392		-2,4	
	29	0329KRitAmf_Dag3_30	AMF_19	687666		6,7	
	30	0329KRitAmf_Dag3_31	AMF_20	697000		8,1	
	31	0329KRitAmf_Dag3_32	AMF_21	685630		6,4	
		32	0329KRitAmf_Dag3_33	AMF_22	694073		7,7
		33	0329KRitAmf_Dag3_34	AMF_23	726574		12,7
		34	0329KRitAmf_Dag3_35	AMF_24	687993		6,7
		35	0329KRitAmf_Dag3_36	AMF_25	710837		10,3
		36	0329KRitAmf_Dag3_37	AMF_26	696349		8,0
		37	0329KRitAmf_Dag3_38	AMF_27	720449		11,8
		38	0329KRitAmf_Dag3_39	AMF_28	572375		-11,2
		39	0329KRitAmf_Dag3_40	AMF_29	554717		-14,0
		40	0329KRitAmf_Dag3_41	qcDRITAMF_S	686489		6,5

MDMA dag 1:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
MDMA-13C6	1	0321KRITAMF_DAG1_05	Std1	1180209		0,9
	2	0321KRITAMF_DAG1_06	Std2	1195851	1169513	2,3
	3	0321KRITAMF_DAG1_07	Std3	1143175		-2,3
	4	0321KRITAMF_DAG1_08	Std4	1051235		-10,1
	6	0321KRITAMF_DAG1_10	qc1RITAMF_S	1219165		4,2
	7	0321KRITAMF_DAG1_11	qc2RITAMF_S	1164270		-0,4
	8	0321KRITAMF_DAG1_12	qc3RITAMF_S	1134951		-3,0
	9	0321KRITAMF_DAG1_13	HOYSTD	973433		-16,8
	12	0321KRITAMF_DAG1_16	AMF_1	1291198		10,4
	13	0321KRITAMF_DAG1_17	AMF_2	1262452		7,9
	14	0321KRITAMF_DAG1_18	AMF_3	1172550		0,3
	15	0321KRITAMF_DAG1_19	AMF_4	1283275		9,7
	16	0321KRITAMF_DAG1_20	AMF_5	1251977		7,1
	17	0321KRITAMF_DAG1_21	AMF_6	1317321		12,6
	18	0321KRITAMF_DAG1_22	AMF_7	1258978		7,6
	19	0321KRITAMF_DAG1_23	RIT_1	1338524		14,5
	20	0321KRITAMF_DAG1_24	RIT_2	1307831		11,8
	21	0321KRITAMF_DAG1_25	RIT_3	1279941		9,4
	22	0321KRITAMF_DAG1_26	R221_PST1B	1056993		-9,6
	23	0321KRITAMF_DAG1_27	R221_PST1A	1062950		-9,1
	24	0321KRITAMF_DAG1_28	R218_PST1B	975422		-16,6
	25	0321KRITAMF_DAG1_29	SPIKET1	1276049		9,1
	26	0321KRITAMF_DAG1_30	SPIKET3	1233274		5,5
	27	0321KRITAMF_DAG1_31	SPIKET5	1230824		5,2
	28	0321KRITAMF_DAG1_32	SPIKET7	1218103		4,2
	29	0321KRITAMF_DAG1_33	SPIKET9	1259105		7,7
	30	0321KRITAMF_DAG1_34	SPIKET11	1230337		5,2
	31	0321KRITAMF_DAG1_35	SPIKET13	1222347		4,5
	32	0321KRITAMF_DAG1_36	SPIKET15	1214310		3,8
	33	0321KRITAMF_DAG1_37	SPIKET17	1212387		3,7
	34	0321KRITAMF_DAG1_38	SPIKET19	1179534		0,9
	35	0321KRITAMF_DAG1_39	MDA_MDMA	1216896		4,1
	36	0321KRITAMF_DAG1_40	qcDRITAMF_S	1193114		2,0

MDMA dag 2:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
MDMA-13C6	1	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_05	Std1	1202609		1,3
	2	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_06	Std2	1203086	1187128	1,3
	3	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_07	Std3	1171171		-1,3
	4	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_08	Std4	1107465		-6,7
	6	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_09	qc1RITAMF_S	1222882		3,0
	7	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_10	qc2RITAMF_S	1226993		3,4
	8	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_11	qc3RITAMF_S	1235909		4,1
	12	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_13	SPIKET2	1212339		2,1
	13	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_14	SPIKET6	1227948		3,4
	14	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_15	SPIKET10	1222427		3,0
	15	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_16	SPIKET14	1214464		2,3
	16	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_17	SPIKET18	1182210		-0,4
	17	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_18	SPIKET22	1191484		0,4
	18	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_19	SPIKET24	1203169		1,4
	19	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_20	SPIKET26	1217928		2,6
	20	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_21	SPIKET28	1158079		-2,4
	21	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_22	SPIKET30	1098782		-7,4
	22	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_23	JH267_LOW	1211752		2,1
	23	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_24	JH267_HIGH	1062461		-10,5
	24	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_25	RIT_4	1227473		3,4
	25	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_26	RIT_5	1242516		4,7
	26	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_27	RIT_6	1300254		9,5
	27	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_28	R218_PST1A	1045445		-11,9
	28	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_29	R218_PST1B	1007375		-15,1
	29	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_30	AMF_8	1231085		3,7
	30	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_31	AMF_9	1271441		7,1
	31	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_32	AMF_10	1294131		9,0
	32	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_33	AMF_11	1243523		4,8
	33	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_34	AMF_12	1277204		7,6
	34	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_35	AMF_13	1200737		1,1
	35	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_36	AMF_14	1325052		11,6
	36	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_37	AMF_15	1272649		7,2
	37	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_38	AMF_16	1301855		9,7
	38	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_39	AMF_17	1271210		7,1
	39	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_40	AMF_18	1180877		-0,5
	40	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_41	qcDRITAMF_S	1252998		5,5

MDMA dag 3:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
MDMA-13C6	1	0329KRitAmf_Dag3_05	Std1	1201090		2,6
	2	0329KRitAmf_Dag3_06	Std2	1181011	1171011	0,9
	3	0329KRitAmf_Dag3_07	Std3	1161011		-0,9
	4	0329KRitAmf_Dag3_08	Std4	1101013		-6,0
	6	0329KRitAmf_Dag3_10	qc1RITAMF_S	1179486		0,7
	7	0329KRitAmf_Dag3_11	qc2RITAMF_S	1168198		-0,2
	8	0329KRitAmf_Dag3_12	qc3RITAMF_S	1171388		0,0
	12	0329KRitAmf_Dag3_13	SPIKET4	1218142		4,0
	13	0329KRitAmf_Dag3_14	SPIKET8	1163841		-0,6
	14	0329KRitAmf_Dag3_15	SPIKET12	1166315		-0,4
	15	0329KRitAmf_Dag3_16	SPIKET16	1158029		-1,1
	16	0329KRitAmf_Dag3_17	SPIKET20	1148008		-2,0
	17	0329KRitAmf_Dag3_18	SPIKET21	1139773		-2,7
	18	0329KRitAmf_Dag3_19	SPIKET23	1155457		-1,3
	19	0329KRitAmf_Dag3_20	SPIKET25	1166105		-0,4
	20	0329KRitAmf_Dag3_21	SPIKET27	1147585		-2,0
	21	0329KRitAmf_Dag3_22	SPIKET29	1121469		-4,2
	22	0329KRitAmf_Dag3_23	RIT_7	1278957		9,2
	23	0329KRitAmf_Dag3_24	RIT_8	1268905		8,4
	24	0329KRitAmf_Dag3_25	RIT_9	1270726		8,5
	25	0329KRitAmf_Dag3_26	RIT_10	1244191		6,2
	26	0329KRitAmf_Dag3_27	R215_PST1A	1051570		-10,2
	27	0329KRitAmf_Dag3_28	R212_PST1B	1037931		-11,4
	28	0329KRitAmf_Dag3_29	R212_PST1A	1042309		-11,0
	29	0329KRitAmf_Dag3_30	AMF_19	1233365		5,3
	30	0329KRitAmf_Dag3_31	AMF_20	1224366		4,6
	31	0329KRitAmf_Dag3_32	AMF_21	1173750		0,2
	32	0329KRitAmf_Dag3_33	AMF_22	1231798		5,2
	33	0329KRitAmf_Dag3_34	AMF_23	1286258		9,8
	34	0329KRitAmf_Dag3_35	AMF_24	1249786		6,7
	35	0329KRitAmf_Dag3_36	AMF_25	1239343		5,8
36	0329KRitAmf_Dag3_37	AMF_26	1245383		6,4	
37	0329KRitAmf_Dag3_38	AMF_27	1291177		10,3	
38	0329KRitAmf_Dag3_39	AMF_28	1192631		1,8	
39	0329KRitAmf_Dag3_40	AMF_29	1163550		-0,6	
40	0329KRitAmf_Dag3_41	qcDRITAMF_S	1198310		2,3	

Ritalinsyre dag 1:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Ritalinsyre-D4	1	0321KRITAMF_DAG1_05	Std1	1764221		14,0
	2	0321KRITAMF_DAG1_06	Std2	1735355	1547874	12,1
	3	0321KRITAMF_DAG1_07	Std3	1360393		-12,1
	4	0321KRITAMF_DAG1_08	Std4	1024433		-33,8
	6	0321KRITAMF_DAG1_10	qc1RITAMF_S	1788187		15,5
	7	0321KRITAMF_DAG1_11	qc2RITAMF_S	1665230		7,6
	8	0321KRITAMF_DAG1_12	qc3RITAMF_S	1201644		-22,4
	9	0321KRITAMF_DAG1_13	HOYSTD	747494		-51,7
	12	0321KRITAMF_DAG1_16	AMF_1	1819843		17,6
	13	0321KRITAMF_DAG1_17	AMF_2	1852711		19,7
	14	0321KRITAMF_DAG1_18	AMF_3	1846990		19,3
	15	0321KRITAMF_DAG1_19	AMF_4	1839399		18,8
	16	0321KRITAMF_DAG1_20	AMF_5	1689910		9,2
	17	0321KRITAMF_DAG1_21	AMF_6	1932012		24,8
	18	0321KRITAMF_DAG1_22	AMF_7	1840561		18,9
	19	0321KRITAMF_DAG1_23	RIT_1	1694578		9,5
	20	0321KRITAMF_DAG1_24	RIT_2	1241450		-19,8
	21	0321KRITAMF_DAG1_25	RIT_3	1717631		11,0
	22	0321KRITAMF_DAG1_26	R221_PST1B	1411092		-8,8
	23	0321KRITAMF_DAG1_27	R221_PST1A	1669672		7,9
	24	0321KRITAMF_DAG1_28	R218_PST1B	1560428		0,8
	25	0321KRITAMF_DAG1_29	SPIKET1	1876541		21,2
	26	0321KRITAMF_DAG1_30	SPIKET3	1831087		18,3
	27	0321KRITAMF_DAG1_31	SPIKET5	1766410		14,1
	28	0321KRITAMF_DAG1_32	SPIKET7	1729258		11,7
	29	0321KRITAMF_DAG1_33	SPIKET9	1739035		12,3
	30	0321KRITAMF_DAG1_34	SPIKET11	1701535		9,9
	31	0321KRITAMF_DAG1_35	SPIKET13	1793083		15,8
	32	0321KRITAMF_DAG1_36	SPIKET15	1698370		9,7
	33	0321KRITAMF_DAG1_37	SPIKET17	1634134		5,6
	34	0321KRITAMF_DAG1_38	SPIKET19	1557441		0,6
	35	0321KRITAMF_DAG1_39	MDA_MDMA	1854074		19,8
	36	0321KRITAMF_DAG1_40	qcDRITAMF_S	1665373		7,6

Ritalinsyre dag 2:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Ritalinsyre-D4	1	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_05	Std1	1818785		14,6
	2	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_06	Std2	1738274	1586778	9,5
	3	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_07	Std3	1435282		-9,5
	4	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_08	Std4	1117401		-29,6
	6	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_09	qc1RITAMF_S	1873815		18,1
	7	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_10	qc2RITAMF_S	1824969		15,0
	8	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_11	qc3RITAMF_S	1746805		10,1
	12	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_13	SPIKET2	1796146		13,2
	13	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_14	SPIKET6	1764786		11,2
	14	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_15	SPIKET10	1737764		9,5
	15	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_16	SPIKET14	1742027		9,8
	16	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_17	SPIKET18	1612130		1,6
	17	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_18	SPIKET22	1520937		-4,1
	18	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_19	SPIKET24	1491503		-6,0
	19	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_20	SPIKET26	1413637		-10,9
	20	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_21	SPIKET28	1258959		-20,7
	21	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_22	SPIKET30	1144664		-27,9
	22	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_23	JH267_LOW	1805058		13,8
	23	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_24	JH267_HIGH	1638606		3,3
	24	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_25	RIT_4	1451859		-8,5
	25	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_26	RIT_5	1665701		5,0
	26	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_27	RIT_6	1383584		-12,8
	27	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_28	R218_PST1A	1469056		-7,4
	28	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_29	R218_PST1B	1510042		-4,8
	29	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_30	AMF_8	1726990		8,8
	30	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_31	AMF_9	1853754		16,8
	31	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_32	AMF_10	1934438		21,9
	32	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_33	AMF_11	1826857		15,1
	33	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_34	AMF_12	1762899		11,1
	34	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_35	AMF_13	1736550		9,4
	35	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_36	AMF_14	1865650		17,6
	36	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_37	AMF_15	1842893		16,1
	37	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_38	AMF_16	1146300		-27,8
	38	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_39	AMF_17	1862061		17,3
	39	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_40	AMF_18	1802422		13,6
	40	0323KRitAmf_Dag2_Samkjoring_41	qcDRITAMF_S	1771419		11,6

Ritalinsyre dag 3:

	NR	Name	ID	IS Area	Gjennomsnitt Std	Avvik fra gj.snitt std (%)
Ritalinsyre-D4	1	0329KRitAmf_Dag3_05	Std1	1650717		18,0
	2	0329KRitAmf_Dag3_06	Std2	1583750	1398510	13,2
	3	0329KRitAmf_Dag3_07	Std3	1213270		-13,2
	4	0329KRitAmf_Dag3_08	Std4	913841		-34,7
	6	0329KRitAmf_Dag3_10	qc1RITAMF_S	1567014		12,0
	7	0329KRitAmf_Dag3_11	qc2RITAMF_S	1497660		7,1
	8	0329KRitAmf_Dag3_12	qc3RITAMF_S	1034231		-26,0
	12	0329KRitAmf_Dag3_13	SPIKET4	1587134		13,5
	13	0329KRitAmf_Dag3_14	SPIKET8	1527227		9,2
	14	0329KRitAmf_Dag3_15	SPIKET12	1456137		4,1
	15	0329KRitAmf_Dag3_16	SPIKET16	1450325		3,7
	16	0329KRitAmf_Dag3_17	SPIKET20	1319353		-5,7
	17	0329KRitAmf_Dag3_18	SPIKET21	1240032		-11,3
	18	0329KRitAmf_Dag3_19	SPIKET23	1204295		-13,9
	19	0329KRitAmf_Dag3_20	SPIKET25	988313		-29,3
	20	0329KRitAmf_Dag3_21	SPIKET27	973910		-30,4
	21	0329KRitAmf_Dag3_22	SPIKET29	908448		-35,0
	22	0329KRitAmf_Dag3_23	RIT_7	1129720		-19,2
	23	0329KRitAmf_Dag3_24	RIT_8	1481758		6,0
	24	0329KRitAmf_Dag3_25	RIT_9	1310312		-6,3
	25	0329KRitAmf_Dag3_26	RIT_10	1538400		10,0
	26	0329KRitAmf_Dag3_27	R215_PST1A	1478240		5,7
	27	0329KRitAmf_Dag3_28	R212_PST1B	1495945		7,0
	28	0329KRitAmf_Dag3_29	R212_PST1A	1523419		8,9
	29	0329KRitAmf_Dag3_30	AMF_19	1583264		13,2
	30	0329KRitAmf_Dag3_31	AMF_20	1548274		10,7
	31	0329KRitAmf_Dag3_32	AMF_21	1577313		12,8
	32	0329KRitAmf_Dag3_33	AMF_22	1597247		14,2
	33	0329KRitAmf_Dag3_34	AMF_23	1638148		17,1
	34	0329KRitAmf_Dag3_35	AMF_24	1569484		12,2
	35	0329KRitAmf_Dag3_36	AMF_25	1558497		11,4
	36	0329KRitAmf_Dag3_37	AMF_26	1612450		15,3
	37	0329KRitAmf_Dag3_38	AMF_27	1629831		16,5
	38	0329KRitAmf_Dag3_39	AMF_28	1606781		14,9
	39	0329KRitAmf_Dag3_40	AMF_29	1170865		-16,3
	40	0329KRitAmf_Dag3_41	qcDRITAMF_S	1443573		3,2

Vedlegg I: Flytskjema RitAmf (ritalinsyre og amfetaminer)

Flytskjema RITAMF Serum

Beskrivelse	Prøve/reagenser/utstyr	Volum	Posisjon Hamilton
Prøveblanding	Std/QC	100 µl	Spor 39, pos 5 (A2-H2)
	Prøver	100 µl	Spor 51 - 54
	RITAMF-IS 20% MeOH i H ₂ O (Amfetamin- ¹³ C ₆ , Metamfetamin- ¹³ C ₆ , MDMA- ¹³ C ₆ , MDM- ¹³ C ₆ , Ritalinsyre- d ₄)	25 µl	Spor 45, pos 5 <i>(Reagenskar 50 ml)</i>
Filtreringsplate	Ostro™ 96-brønnsplate		Spor 39, pos 4 Plasseres oppå en mikrotiterplate
Fellingsreagens	ACN m/ 1% FAc <i>(iskald, rett fra fryser)</i> NB! Reagenskaret må være minst halvfullt	375 µl	Spor 39, pos 3
Engangsspisser (Std/QC, prøver)	MIStar 300 µl standard volum spiss med filter		Spor 21 og 27, pos 4
Engangsspisser (Internstandard)	MIStar 50 µl standard volum spiss med filter		Spor 21, pos 5
Engangsspisser (Fellingsreag. serum)	MIStar 1000 µl standard volum spiss med filter		Spor 21, pos 2
Tom plate til engangsspisser	Tip Support		Spor 27, pos 2

NB! Rackene med pasientprøver, spisser og ostroplate skal være dratt ut før start for lesing av barkode. De trekkes automatisk inn.

PPP

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

Reløses i 100 µl 10% MeOH i H₂O (Enten manuelt eller på Tecan C)

Beskrivelse	Prøve/reagenser/utstyr	Volum	Posisjon TECAN C
Tilsetting av reløsningsreagens	Analyseplate (Waters 2 ml 96-dypbrønnsplate)		Grid 17-4
	Engangsspisser DiTi 200 µl		Grid 1-1 Site 15
	10 % MeOH	100 µl	Grid 25-2

Dypbrønnsplaten forsegles med matte

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

Settes i autosampler (10 °C) for analyse

Arbeidslistekode: RITAMF**Robotscript**

Robot	Script	Utfører
Hamilton ML Star	RITAMF vx x*	
Tecan	RITAMF S reløsning TecCx	Reløsning

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

Instrumentinformasjon

Beskrivelse	Innstillinger
Metode	RITAMF S x
Analyseinstrument	LC-MSMS
Mobilfaser	A1: 5 mM NH ₄ -format, pH 10,1 B2: ACN
Injeksjonsvolum	2 µl
Run-tid	3,2 min
Tolkningsmetode RITAMF	RITAMF S TolKx

(x=versjonsnr.)

Holdbarhet:

Tinte standarder og kontroller lagret ved 4-8 °C er holdbare i fem dager.

Pasientprøver kan oppbevares i 4 uker ved 4-8 °C.

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