

Forord

Rapporten er en del av studieforløpet ved Institutt for bioingeniørfag ved NTNU. Oppgaven ble gitt og utført ved Avdeling for klinisk farmakologi (AKF) ved St.Olavs hospital. AKF er en av seks laboratoriemedisinske avdelinger ved St.Olavs hospital i Trondheim. Avdelingen utfører analysering av medikamenter og rusmidler, medisinsk tolkning av alle prøvesvar i tillegg til rådgivning til både primær- og spesialisthelsetjenesten.

Oppgaven gikk ut på å validere en metode for analyse av to antipsykotika og et antidepressiva og deres metabolitter i fullblod ved bruk av UPLC-MSMS. Oppgaven er et resultat av et godt samarbeid gjennom hele prosjektet.

En stor takk tildeles våre veiledere ved avdelingen Maja Lovenich og Sarita Hammes, de har gitt gode og trygge rammer for læring, og de har vært tilgjengelig for absolutt alle spørsmål en måtte ha. I tillegg ønsker vi å takke resten av de ansatte ved Avdeling for klinisk farmakologi, for å ha tatt godt imot oss, og gitt oss tid og rom til å utføre arbeidet i forbindelse med både laboratoriearbeid og skriving. Til slutt retter vi en takk til vår prosessveileder fra fakultetet Margareth Nupen. Vi setter stor pris på at hun har lest og evaluert flere utkast og gitt gode råd tilknyttet oppgaveskrivingen.



Kristin Bakken



Siren Aas Berg



Lina Hammer

Trondheim 15. mai 2023

Sammendrag

Validering av metode for kvantifisering av antipsykotika (klozapin og kvetiapin) og antidepressiva (mirtazapin) og deres metabolitter (DM-klozapin, DA-kvetiapin, DM-mirtazapin) i fullblod med bruk av serumatriks som standard ble gjennomført på UPLC-MSMS.

Fullblod er det vanligste av de tilgjengelige prøvematerialene ved analyse av postmortale prøver. Analyse av slike prøver er aktuelt for å undersøke tilstedeværelse eller konsentrasjon av antipsykotika eller antidepressiva i avdøde. Metodens prøveopparbeidelse var proteinfelling og filtrering med acetonitril og OstroTM-plate. Separasjonsprinsippet var omvendt fase-kromatografi og deteksjonen var tandem massespektrometer.

Valideringsparameterne for validering av metoden var å undersøke signal-til-støy forhold, nedre kvantifiseringsgrense, linearitet, repeterbarhet, reproduserbarhet, nøyaktighet og holdbarhet. Resultatene fra analysene ble sammenlignet med akseptkriterier fra laboratoriet.

Resultatene viste at den nedre deteksjonsgrensen kan beholdes siden alle S/N-forhold var godt innenfor S/N-kravet på over 30. Metoden hadde god linearitet (gjennomsnittlig $R > 0,9998$). I tillegg var serum-standardkurve sammenfallende fullblod-standardkurve. Det var derfor mulig å bruke serumstandarder til analyse av fullblodsprøver. Resultatene for repeterbarhet var alle innenfor kravet på $\leq 10\%$. Reproduserbarhet og nøyaktighet hadde også alle resultater innenfor oppgitte krav på $\leq 15\%$. Holdbarheten til analyttene i dypbrønnsplaten viste god holdbarhet fram til og med dag 5. Dermed kan opparbeidede prøver analyseres etter oppbevaring i fem dager ved 10°C .

Undersøkelsen har vist at det er mulig å kvantifisere medikamentene (klozapin, kvetiapin og mirtazapin) og metabolittene (DM-klozapin, DA-kvetiapin og DM-mirtazapin) i fullblod med serumatriks som standard. Holdbarheten til opparbeidede prøver i dypbrønnsplaten er satt til fem dager ved 10°C .

Abstract

Validation of a method for quantification of antipsychotics (clozapine, quetiapine) and antidepressants (mirtazapin) and their metabolites (DM-clozapine, DA-quetiapine, DM-mirtazapine) in whole blood using serummatrix as a standard, was carried out on UPLC-MSMS.

Whole blood is the most common of the available sample material when analyzing postmortem samples. Analysis of postmortem samples is relevant to examine the presence or concentration of the analytes and their metabolites in a deceased person. The sample preparation included protein precipitation and filtration with acetonitrile and OstroTM-plate. The separation principle was reverse phase chromatography, and the detection was tandem mass spectrometer.

The validation parameters for the validation of the method included looking into the signal/noise ratio, lower limit of quantification, linearity, precision, accuracy and durability. The results were compared to the laboratory's acceptance criteria.

The results showed that the lower detection limit can be retained because all the S/N values were well within the requirement of ≥ 30 . The method had good linearity (average $R > 0,9998$). The serum calibration curve was coinciding with the whole blood calibration curve. It was therefore possible to use serum standards for analysis of samples in whole blood. The results from the repeatability were within the stated requirements on $\leq 10\%$. Reproducibility and accuracy also had results within stated requirements on $\leq 15\%$. The durability results of the analytes in the 96-well plate, showed good durability up to day 5. Therefore, processed samples can be analyzed after five days storage at 10°C .

The validation experiments have shown that it is possible to validate the medicaments (Clozapine, Quetiapine, Mirtazapine) and the metabolites (DM-Clozapine, DA-Quetiapine, DM-Mirtazapine) in whole blood with serummatrix used as standard. The durability of processed samples in the plate is set to five days at 10°C .

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag	II
Abstract.....	III
Innholdsfortegnelse.....	IV
1. Innledning	1
1.1. Hensikt.....	1
1.2. Antipsykotika og antidepressiva.....	1
1.3. Proteinfelling og filtrering	2
1.4. Prøvematerialet	4
1.5. Omvendt fase kromatografi	6
1.6. Deteksjon ved massespektrometri	8
1.7. UPLC-MSMS	11
1.8. Valideringsparametere.....	12
1.9. Problemstillinger.....	15
2. Materiale og metode	16
2.1. Prøvematerialet	16
2.2. Internstandard og utstyr	16
2.3. Prøveopparbeidelse.....	18
2.4. Analysebetingelser for UPLC.....	18
2.5. Deteksjonsinnstillinger for MSMS.....	19
2.6. Valideringsparametre og akseptkriterier.....	20
3. Resultater og diskusjoner.....	22
3.1. Nedre kvantifiseringsgrense	22
3.2. Linearitet og kurvetilpasning	23
3.3. Repeterbarhet.....	28
3.4. Reproduserbarhet og nøyaktighet	30
3.5. Holdbarhet autosampler.....	32
4. Konklusjon.....	33
5. Referanser	34
6. Vedlegg.....	36

1. Innledning

1.1. Hensikt

Klozapin og kvetiapin er antipsykotika og mirtazapin er et antidepressiva. Disse analyseres og kvantifiseres ved hjelp av kromatografiske metoder og massespektrometrisk deteksjon.

Ultrapresisjonsvæskerkromatografi (UPLC) brukes som det kromatografiske instrumentet og den massespektrometriske deteksjonen for analysen er tandem massespektrometri (UPLC-MS/MS).

Analyse av serumprøver brukes for å bestemme om pasienters dosering er innenfor terapeutisk område. Det er allerede validert en metode som analyserer de tre analyttene og deres metabolitter i serum. Det skal nå undersøkes om analyse av de samme analyttene og metabolittene kan utvides til fullblod, slik at postmortale prøver kan analyseres. Dette er fordi serum ikke er tilgjengelig ved postmortale prøver, ettersom blodet har begynt å koagulere. For å bestemme dødsårsak ved en obduksjon kan det være nyttig å få vite innhold av medikamenter, og metabolitter av disse, i den avdødes blod. Det kan være aktuelt å se etter medikamenter som påvirker kroppen fysisk, men også medikamenter som endrer sinnstilstanden. I denne metoden analyseres psykofarmaka og antidepressiva fordi den avdøde kan ha inntatt medikamenter som endrer deres sinnstilstand, eller eventuelt ikke tatt medikamenter som en trenger for å bevare sin normale sinnstilstand.

For å undersøke om det kan analyseres metabolitter i fullblod for postmortale prøver, skal det sammenlignes standardkurver fra serum og fullblod for å bestemme om standardkurver i serum kan benyttes ved analysering av fullblodsprøver. I tillegg skal valideringsparametrene riktighet, presisjon og holdbarhet undersøkes.

1.2. Antipsykotika og antidepressiva

Klozapin

Klozapin er et medikament som brukes til behandling av psykoser. Medikamentet medfører alvorlige bivirkninger, blant annet agranulocytose, og benyttes ikke med mindre andre medikamenter ikke har hatt ønsket effekt. Klozapin har en halveringstid på 12 timer (1,2).

Kvetiapin

Kvetiapin benyttes også i behandling av psykotiske tilstander, og gir sedasjon. Medikamentet kan benyttes for søvnvansker, med da i mye lavere doser. Kvetiapin har en halveringstid på 6 timer (3,4).

Mirtazapin

Mirtazapin er et antidepressivt medikament som også kan brukes til søvnvansker. Medikamentet vil i noen tilfeller gi en hypnotisk effekt. Mirtazapin har en halvveringstid på 20-30 timer (5).

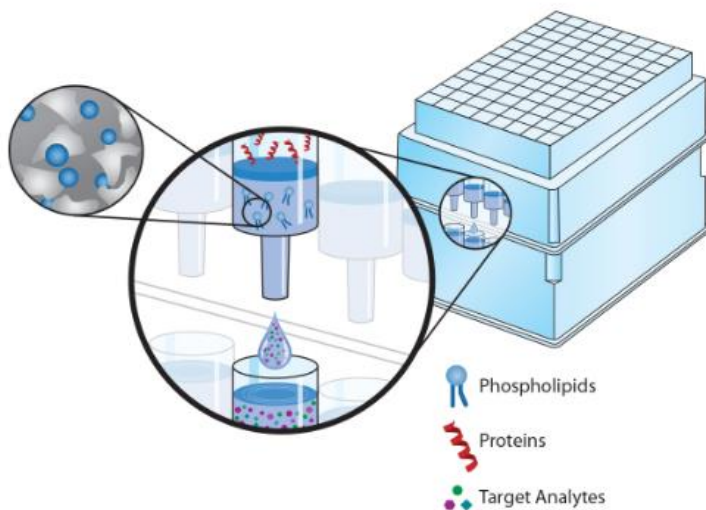
Alle de tre medikamentene klozapin, mirtazapin og kvetiapin kontrolleres med blodprøvekontroller for å undersøke om pasientens dose er innenfor terapeutisk område. Terapeutisk område er det konsentrasjonsområde hvor medikamentet har god effekt, og mengden bivirkninger er lavest mulig. Dersom dosering overstiger terapeutisk område, vil ikke den ønskede virkningen veie opp for de negative bivirkningene (6). Ved å inkludere medikamentenes metabolitter får man lengre påvisningstid. Medikamentene har ulik halveringstid og avhengig av hvor lenge etter inntak prøvene tas, kan hele eller deler av forbindelsene allerede ha blitt brutt ned i kroppen. I tilfeller hvor man ikke kan påvise moderstoffet kan man da påvise metabolittene, og dermed kan man si noe om inntak av moderstoff selv om det er metabolisert i kroppen (7).

1.3. Proteinfelling og filtrering

Før analyseringen av analyttene og metabolittene kan utføres, må prøvematerialet gjennom en opparbeidelse for å fjerne interfererende stoffer som naturlig befinner seg i matriks. I kromatografiske metoder vil interferensen og forurensningen ødelegge for analysens sensitivitet, og redusere kolonnens levetid. Proteiner kan være bundet til analytten man ønsker å se på, og derfor vil en proteinfelling også være nyttig for å bryte analytt-proteinbindingen. Den interfererende effekten til de andre komponentene i prøven vil kunne ha betydelig påvirkning på både prøve kvalitet og prøvesvar. Dette kalles matrikseffekt, og påvirker deteksjonen i massespektrometeret. Ved matrikseffekt sees ionesuppresjon eller økt ionisering, noe som

påvirker analyttens signal slik at det ikke lenger er representativt for konsentrasjonen. Selv om blodet inneholder ioner, vitaminer og aminosyrer, er fosfolipider den substansen som mest sannsynlig gir matrikseffekt (8,9). Forskjellen mellom serum og fullblod vil kunne være synlig i mengden matrikseffekt. Serum er den koagulerende væskebaserte delen av fullblod. Fullblod består dermed av flere komponenter enn serum, det er altså mer som bør bli filtrert vekk. Det er ikke mulig å filtrere vekk absolutt alt, derfor er fullblod mer utsatt for å inneholde substanser ved analyse som kan påvirke deteksjonen av analytt (10).

Direkte injeksjon av serum inn i LC er ikke anbefalt på grunn av at proteiner ved kontakt med organiske løsemidler og buffersalter som er vanlig i den mobile fasen, kan felles ut. Utfelte proteiner i LC-kolonnen vil derfor forstyrre kvaliteten på resultatene fra kromatografien. Acetonitril (ACN) er et polart organisk fellingmiddel og er blandbart med serum. Når proteinene kommer i kontakt med ACN under opparbeidelsen, vil de denatureres og deretter felles ut. Før supernatanten kan analyseres i LC fjernes fosfolipider ved at væsken filtreres gjennom en Ostro™-plate og samles opp i en dypbrønnsplate. Ved å fjerne proteiner og fosfolipider unngår man at de interferer under separasjon og deteksjon (9). Figur 1.1 viser prinsippet for fjerning av utfelte proteiner og lipider fra supernatanten.



Figur 1.1: Viser prinsippet for filtrering av proteiner og fosfolipider, der disse holdes igjen slik at det kun er analyttene som filtreres ned i dypbrønnsplaten (11).

1.4. Prøvematerialet

Standardrekke og kontroll

Ved analysering av analytter og metabolitter kromatografisk i denne metoden, benyttes standardrekker. En standard er en løsning der konsentrasjonen av stoff er kjent. 0-Serum eller 0-fullblod er blodgiverblod som ikke inneholder noen av analyttene fra før av, og som tilsettes analytter i kjent mengde før de deretter opparbeides på samme måte som pasientprøver. Når disse analyseres kromatografisk vil det bli laget en kalibreringskurve som viser sammenhengen mellom signal lest på detektoren og mengde stoff i prøvene. Kalibreringskurven for denne metoden vil ideelt sett være lineær og benyttes til å beregne konsentrasjonen i prøver med ukjent innhold (12).

Man skiller mellom interne- og eksterne-kvalitetskontroller. Kvalitetskontroller er viktige for å vurdere analysens riktighet og presisjon og det er disse som avgjør om pasientprøvesvar skal godkjennes eller ikke. Dette baseres på at de behandles og opparbeides på samme måte som pasientprøver, og derfor er de også representative for resultatene. Interne kvalitetskontroller er kontroller som administreres av laboratoriet selv, og analyseres alltid sammen med pasientprøver. Eksterne kvalitetskontroller er kontroller tilsendt fra eksterne laboratorium, som en ikke vet fasitverdien til. Disse brukes som en felles kontroll på tvers av landets laboratorium. Hvis kvalitetskontrollene avviker fra sine teoretiske verdier, kan man ikke stole på at pasientprøver med ukjente konsentrasjoner er riktige. Man benytter kontroller i ulike konsentrasjonsnivåer for å kunne se om kalibreringskurven er god nok ved alle slags nivåer (12).

Internstandard

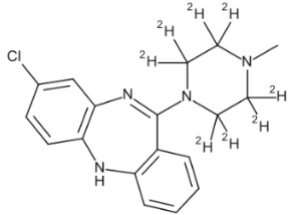
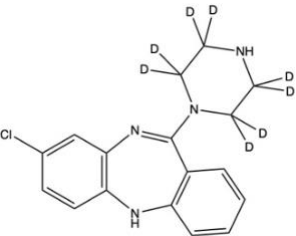
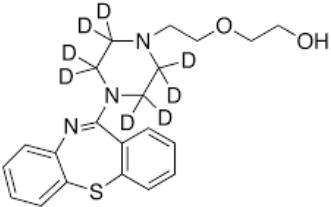
Internstandard (IS) tilsettes alle standarder, kontroller og prøver. Under prøveoppbeidelsen tilsettes IS i kjent volum. IS har omtrent samme fysiske og kjemiske egenskaper som analyttene og de vil derfor oppføre seg likt. Internstandard benyttes for å korrigere for eventuelt tap under oppbeidelse og analysering, fordi konsentrasjonen til IS har en fast verdi, selv om analyttens konsentrasjon varierer (12).

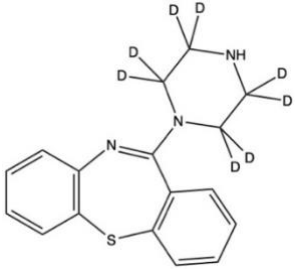
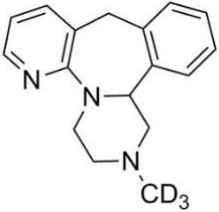
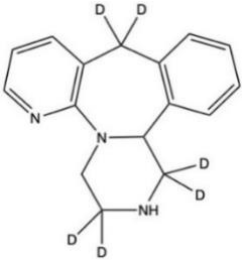
IS har som regel en retensjonstid som er nesten lik retensjonstiden til analyttene for å kunne sammenligne toppene uten at de interferer. Det er også nødvendig at IS har en konsentrasjon midt i måleområdet, slik at eventuelt tap av analytt kan sammenlignes med tap av IS. Dersom IS

ikke varierer tilsvarende som analytt under analyse og opparbeidelse, forsvinner funksjonen. Stoffe som benyttes som IS skal ikke være til stede i prøvematerialet. IS må ha høy renhet og ikke reagere med andre komponenter i prøven for å kunne gi et så nøyaktig mål på analytt-tap som mulig (9).

I analysen av disse antipsykotika og antidepressiva er IS følgende stoffer med kjent konsentrasjon: klozapin-d₈, DM-klozapin-d₈, kvetiapin-d₈, DA-kvetiapin-d₈, mirtazapin-d₃ og DM-mirtazapin-d₆. Det brukes en deuterert versjon av analytt som IS fordi disse strukturene vil oppføre seg likt som analyttene, men toppene vil ikke overlappe. De kjemiske strukturene til IS er vist i tabell 1.1.

Tabell 1.1: Molekylstruktur til IS

<i>IS</i>	<i>Struktur</i>
Klozapin-d ₈	
DM-klozapin-d ₈	
Kvetiapin-d ₈	

DA-kvetiapin-d ₈	
Mirtazapin-d ₃	
DM-mirtazapin-d ₆	

IS = Internstandard. DM = desmetyl. DA = desalkyl.

1.5. Omvendt fase kromatografi

Ved separasjon ved omvendt fase er mobilfasen (MF) polar og stasjonærfasen (SF) upolar. SF har da affinitet til upolare grupper slik at de mest upolare analyttene retarderes mest. Denne metoden benytter en C18 kolonne, bestående av en alkylkjede med 18 karbonatomer. Kolonne varierer fra metode til metode, og lengden på alkylkjeden avgjør hvor upolar SF blir. MF pumpes gjennom kolonnen med konstant volum per tidsenhet. Ved omvendt fase vil forholdet mellom

vann og organiske løsemidler påvirke hvor raskt MF eluerer prøvekomponenten gjennom SF. I en blanding av organisk løsemiddel og vann vil økt mengde organisk løsemiddel gi redusert retensjonstid. Dette fordi økt mengde av den minst polare komponenten reduserer retensjonen. Desto mer vann i MF, jo lengre retensjonstid vil analyttene ha, ettersom vann vil gjøre MF mer polar. (14).

Fordelingen av prøvekomponentene mellom SF og MF gjenspeiles i retensjonsfaktoren, K . Se formel 1.5-1. Jo høyere K -verdi jo større affinitet har analytten til SF.

Formel 1.5-1

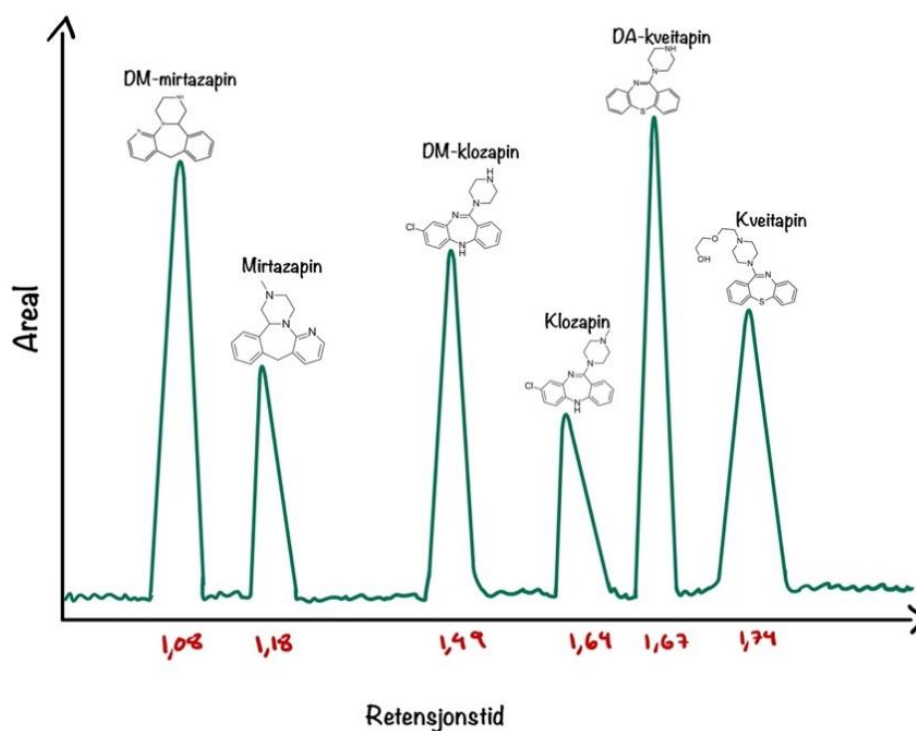
$$K = \frac{C_{SF}}{C_{MF}}$$

K = retensjonsfaktor

C_{SF} = konsentrasjon stasjonærfase

C_{MF} = konsentrasjon mobilfase

Klozapin, kvetiapin, mirtazapin og deres metabolitter har ulike K -verdier som gjør at stoffene kommer ut av den kromatografiske kolonnen på forskjellige tidspunkt. Vandringshastigheten til analytter ved omvendt fase kromatografi vil hovedsakelig påvirkes av deres polare eller upolare egenskaper. Retensjonstiden (t_R) benyttes til å identifisere forbindelsene. I figur 1.2 er elueringsrekkefølgen av DM-mirtazapin, mirtazapin, DM-klozapin, klozapin, DA-kvetiapin og kvetiapin satt opp etter avtagende polaritet. DM-mirtazapin er mest polar med t_R på 1,08 og kvetiapin er minst polar med 1,74 t_R .



Figur 1.2: Kromatogrammet viser retensjonstid og elueringsrekkefølgen av DM-mirtazapin, mirtazapin, DM-klozapin, klozapin, DA-kvetiapin og kvetiapin

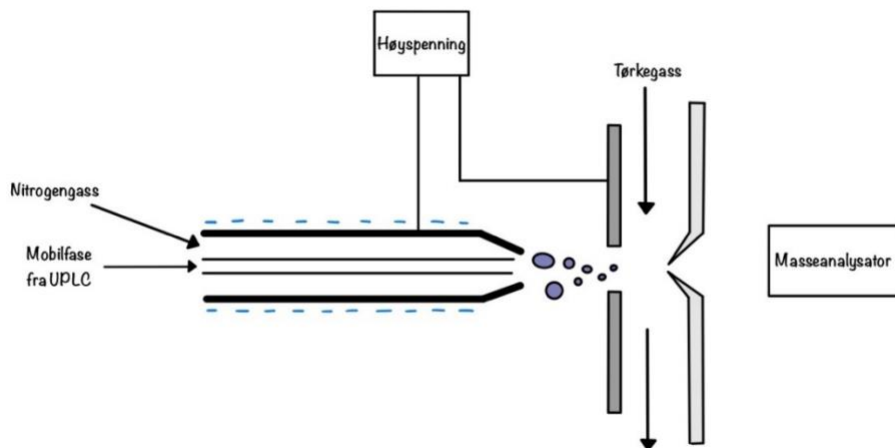
Vandrings hastigheten påvirkes også av temperatur, trykk og pH. Økt temperatur vil gi lavere retensjonstid og raskere eluering vil oppstå. Dersom analyttene inneholder en eller flere sure eller basiske funksjonelle grupper kan endringer i retensjonen oppstå hvis pH i mobilfasen endres. pH endrer ioniseringstilstanden til molekylet og polariteten vil dermed endres som resultat.

1.6. Deteksjon ved massespektrometri

Et massespektrometer detekterer et signal avhengig av konsentrasjon og mobilfasehastighet til analytten. Dette er en massefølsom detektor som gir informasjon om strukturen til analytten basert på et masse-ladning-forhold, i tillegg til at den kvantifiserer. Detektoren består vanligvis av tre hovedbestanddeler; ionekilde, masseanalysator og detektor. I denne metoden brukes Xevo TQ-XS MS systemet (15,16). Alle stegene fra ionisering til deteksjon må skje ved svært lavt

trykk, i et vakuumkammer. Dette er fordi fragmentene er så små at de vil kollidere med gasspartikler, og skifte retning og miste fart før de når detektoren. Derfor er både ionekilden, masseanalysatoren og detektoren plassert i et vakuumkammer (15).

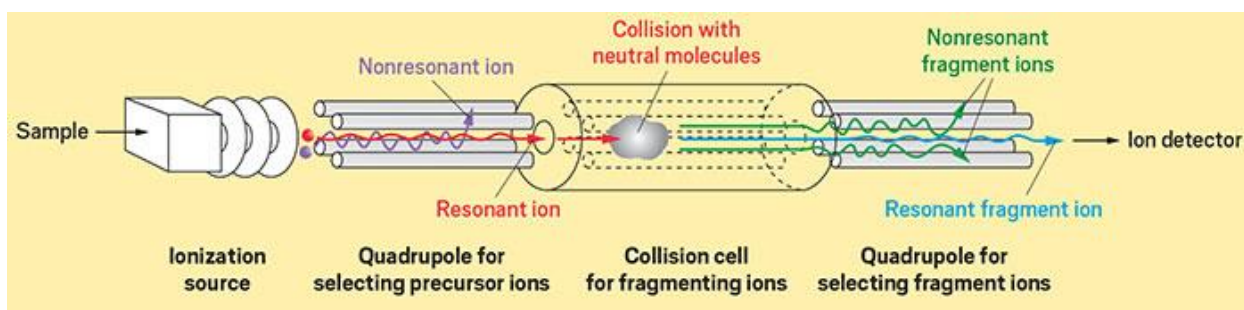
I ionekilden ioniseres molekylene fra prøven og fragmenteres til mindre deler. Hvor mye de fragmenteres er avhengig av strukturen, og hvor mye energi som tilføres. I denne metoden brukes elektronspray-ionisering i positiv modus (ESI+) som ionekilde, se figur 1.3. Den mobile fasen føres inn i ESI-modulen ved hjelp av en dyse, hvor den flytende væsken blir til gass. Her er det koblet på høyspenning som gir overflaten av væsken en positiv ladning idet den beveger seg gjennom dysen, og dette gir ladede dråper når de kommer ut av kapillæret. Langs denne dysen føres det også nitrogengass, som forstøver væsken til aerosoler, samtidig som det hjelper med å separere mobilfasen fra prøven. Deretter vil de ladede dråpene møte en oppvarmet tørkegass, som i dette tilfellet er hydrogengass. Dette vil gi enda mindre dråper og økt ladning fordelt på masse, samtidig som mobilfasen fordamper fra overflaten og ioner formes. Ionene føres videre inn i instrumentet både av vakuum og av ladningsforskjellen mellom ioneblokka og vakuumkammeret (14–16).



Figur 1.3: Skjematisk oversikt over ESI-modulen. Mobilfase og nitrogengass føres ut av en dyse slik at ladede dråper formes. En tørkegass møter dråpene og ioner formes før de føres videre innover i masseanalysatoren.

Massen til de ulike ioniserte molekylene bestemmes i masseanalysatoren, som fordeler fragmentene basert på masse-ladning-forholdet (m/z). Det finnes flere ulike masseanalysatorer,

og det er ofte forskjellen på hvordan de separerer m/z -verdiene som skiller de. For eksempel kan de skilles ved bruk av magnetfelt ved hjelp av et magnetinstrument, eller de kan skilles ved bruk av kvadrupolinstrumenter som bruker strøm eller ved hjelp av et time-of-flight (TOF) instrument. Denne metoden bruker en tandem kvadrupol, med kollisjonsgass imellom, slik som beskrevet i figur 1.4. Dette betyr at de ladede, forstøvede partiklene møter en kvadrupol med påsatt spenning, som separerer ut kun de m/z -ratioene man er ute etter. En kvadrupol er sammensatt av fire runde metallstenger som er satt på en kombinasjon av likestrøm og vekselstrøm. Avhengig av hvilken kombinasjon og styrke som er satt på de fire stengene, vil de separere ut utvalgte ioner med en bestemt m/z -ratio, som vil kunne vandre i en stabil og rett bane gjennom kvadrupolen. De andre partiklene vil endre retning og kollidere i kvadrupolen eller havne utenfor. Mellom kvadrupolene og kollisjonscellen er det også satt på prefilter med et lite hull i midten. Dette fungerer som en ekstra sikkerhet slik at kun de partiklene med en rett strekning gjennom kvadrupolen skal kunne passere, mens andre partikler som har en nesten rett retning vil kollidere i filteret. Etter den første kvadrupolen føres de utvalgte partiklene inn mot en kollisjonsgass, i dette tilfellet argon, som fragmenterer og splitter de enda mer. Dette gir mulighet for at den andre kvadrupolen separerer ut mindre og utvalgte fragmenter. De fragmentene som til slutt føres videre til detektoren vil da være separert ut i to ulike omganger (14–16).



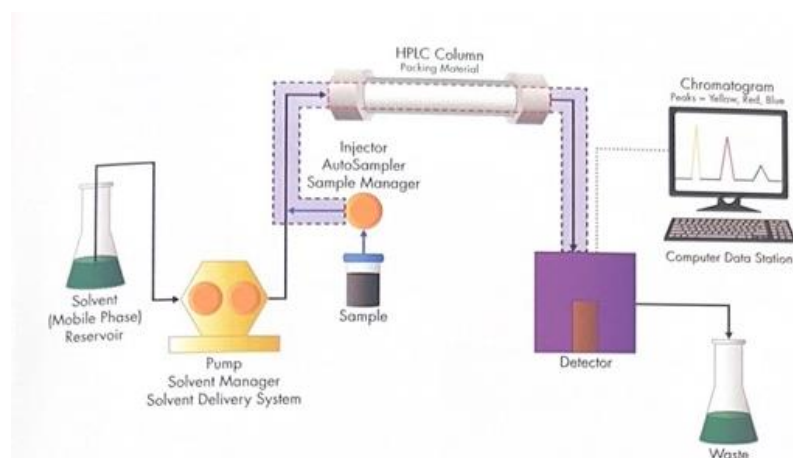
Figur 1.4: Tandem kvadrupol med kollisjonsgass-celle imellom. Viser hvordan ionene beveger seg igjennom kvadrupolene og kollisjonsgassen før de når detektoren (16).

Etter fragmentering og separering møter fragmentene en detektor. Denne detekterer m/z , og er vanligvis plassert slik at den detekterer etter hvert som fragmentene kommer ut av analysatoren. Detektoren kan være innstilt på spesifikke m/z -verdier og gi kromatogrammer basert på single-ion monitoring (SIM), eller den kan se på flere m/z -verdier med multiple-ion monitoring (MIM).

Dette gir mulighet for veldig lave deteksjonsgrenser, da en kan innstille detektoren på bare de fragmentene som analytten gir. Denne metoden benytter en PMT (photomultiplier conversion dynode) detektor, innstilt på MIM. Når de positive ionene møter detektoren treffer de først en elektrode hvor de eksiterer elektroner. Disse elektronene treffer deretter en fosforplate som igjen emitterer fotoner og som til slutt treffer en fotokatode. Denne fotokatoden er plassert foran en fotomultiplikator som amplifiserer signalet før det registreres i datasystemet (14–16).

1.7. UPLC-MSMS

UPLC-MSMS er en metode hvor den kromatografiske kolonnen separerer prøven, og massespektrometeret fungerer som et filter og en detektor. Figur 1.5 viser hvordan komponentene er satt sammen i UPLC-MSMS. Resultatene presenteres i et massekromatogram, som viser relativ intensitet, fra MSMS, som en funksjon av retensjonstiden, fra LC. Ved tandem MS og to kvadrupoler vil spesifisiteten til analysen bli veldig høy. I væske-væske kromatografien separeres komponentene slik at de kommer inn i MSMS til ulike tider. Dette gjør det mulig å innstille MS til å detektere bestemte fragmenter innenfor en bestemt tid basert på analyttens retensjonstid i LC. Ved å gjøre dette vil analysen få høy spesifisitet, men også høy sensitivitet, fordi det vil være minimalt med støy i masseanalysatoren (17).



Figur 1.5: Skjematisk oversikt over UPLC/HPLC, som viser prøvens gang gjennom maskinen (18).

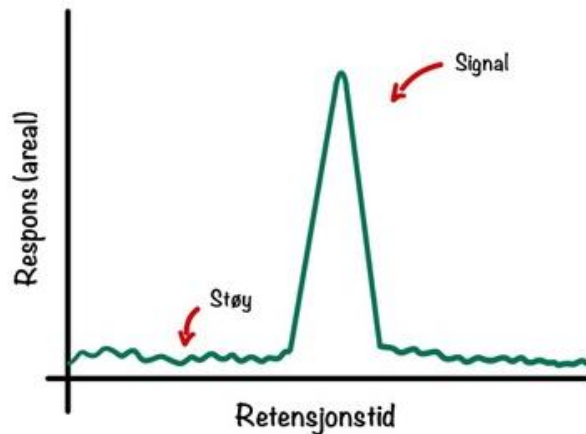
1.8. Valideringsparametere

Før en ny metode kan tas i bruk i et medisinsk laboratorium må det utføres en validering, der metodens kliniske nytteverdi, praktiske egnethet og analytiske kvalitet gjennomgås. Dette er en omfattende prosess. Noen ganger vil enkelte opplysninger allerede være kjent, og man kan foreta en enklere validering enn man ville gjort hvis metoden var helt ny. Det foreligger en felles overordnet mal, som alle valideringsplaner utarbeides fra. Denne malen setter bare visse rammer, men variasjon i hvilke opplysninger som er kjent, gjør at planene er ulike fra metode til metode. Vanlig praksis er dermed å lage en ny valideringsplan tilpasset den aktuelle metoden der man velger hvilke analytiske parametere som skal fungere som kriterier ((19,20).

For denne oppgaven inkluderer metodevalideringen at metodens analytiske kvalitet gjennomgås. Dette innebærer beregning av signal-til-støy (S/N-forholdet) i blod, sammenligning av serum- og fullblod-standardkurver, undersøkelser på riktighet, holdbarhet, linearitet og presisjon.

S/N forhold og nedre deteksjonsgrense

S/N-forholdet er forholdet mellom detektert signal og bakgrunnsstøy i et kromatogram. Figur 1.6 viser hva som er signal og bakgrunnsstøy i et kromatogram. Bakgrunnsstøy er stoffer i matriks som påvirker analyseresultatet og som er synlig i kromatogrammet. Dette kan forstyrre deteksjonen og gjøre det vanskeligere å lese av signalet i kromatogrammet dersom toppene blir for nære hverandre og det blir vanskeligere å avgjøre hvor de starter og stopper. Fordi serum er en bestanddel i fullblod vil fullblod inneholde flere komponenter. Derfor må det undersøkes om kromatogrammene til fullblodsprøver blir preget av mer bakgrunnsstøy. Denne bakgrunnsstøyen vil føre til at selektiviteten til analytter og metabolitter i fullblod kan bli dårligere og deteksjonsgrensen må eventuelt bli satt høyere enn hva den er i serum. En lav kvantifiseringsgrense vil være mer sårbar for bakgrunnsstøy fordi toppene vil være vanskelig å separere. Som vist i figur 1.6 vises bakgrunnsstøy som små topper nær x-aksen. Dersom analyttens signal er lavt, og veldig likt bakgrunnsstøyet, vil det være vanskelig å kvantifisere analytt basert på arealet. Når responsen til støy og signal blir for nære hverandre, blir det vanskelig å bestemme hvor signalet starter og slutter, og derfor også vanskelig å bestemme arealet.



Figur 1.6: Framstilling av signal og støy i et kromatogram, med respons på y-aksen og retensjonstid på x-aksen.

Standardkurvens linearitet

Serum-standardkurve og fullblod-standardkurve sammenlignes for å undersøke om serum-standardkurve kan benyttes til kvantifisering av fullblodsprøver. Hvis avviket mellom kurvene tilfredsstillers akseptkriteriet, slipper man å lage egne standarder i fullblod og sparer dermed tid.

Standardkurvens linearitet vurderes ved hjelp av korrelasjonskoeffisienten (R) og residualer. Korrelasjonskoeffisienten er et mål på hvor mye to sett med data samsvarer og man benytter denne for å vurdere hvor lineær kurven er. Det anbefalte akseptkriteriet for valideringens kurvetilpasning er $R \geq 0,985$. Residualer er verdier som forteller hvor langt vertikalt dataen ligger fra den horisontale regresjonslinjen i et residualplott. Residualene skal være tilfeldig fordelt om regresjonslinjen (21).

Presisjon, nøyaktighet, riktighet og holdbarhet

Riktighet vurderes ved hjelp av % bias, som er et mål på hvor langt sann verdi og målt verdi er fra hverandre. Denne beregnes med formel 1.8-1. Presisjon vurderes med variasjonskoeffisienten (%CV) og er et estimat på overensstemmelsen mellom måleresultater. Man deler presisjonen inn i repeterbarhet og reproduserbarhet. Repeterbarhet er samsvar mellom resultatene fra samme prøve utført i flere paralleller under samme målebetingelser. Reproduserbarhet er samsvar

mellom resultatene fra samme prøve utført under endrede målebetingelser. Man beregner %CV med formel 1.8-2. Holdbarheten vurderes ved å måle samme prøve over flere dager og deretter se på det relative avviket mellom dagene med formel 1.8-3 og vurdere %CV (22).

Formel 1.8-1

$$\%Bias = \frac{\bar{x}_{m\ddot{a}lt} - \bar{x}_{teoretisk}}{\bar{x}_{teoretisk}} \cdot 100\%$$

Formel 1.8-2

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Formel 1.8-3

$$Relativt\ avvik = \frac{Ny\ verdi - Opprinnelig\ Verdi}{Opprinnelig\ Verdi} \cdot 100\%$$

1.9. Problemstillinger

Denne oppgaven har som hensikt å validere metoden for kvantifisering av to antipsykotika, en antidepressiva og deres metabolitter i fullblod ved bruk av standarder i serummatris. Oppgavens problemstillinger er som følger:

- *Undersøke om standarder og kontroller i serummatris kan erstatte standarder og kontroller i blodmatris for klozapin, DM-klozapin, kvetiapin, DA-kvetiapin, mirtazapin og DM-mirtazapin i fullblod, ved å se på S/N og linearitet.*
- *Undersøke om holdbarheten til opparbeidede standarder, kontroller og prøver ved lagring i 10°C er tilstrekkelig for konsentrasjonsbestemmelse etter 3-5 dager, ved å se på avvik fra teoretisk verdi.*
- *Bestemme om metoden i fullblod er egnet til kvantifisering av klozapin, DM-klozapin, kvetiapin, DA-kvetiapin, mirtazapin og DM-mirtazapin i postmortale prøver. Dette bestemmes ved å undersøke repeterbarhet, reproduserbarhet og nøyaktighet, som CV og bias.*

2. Materiale og metode

2.1. Prøvematerialet

Prøvematerialet som ble brukt var 0-serum og 0-blod fra blodbanken, tilsatt klozapin, kvetiapin, mirtazapin, DM-klozapin, DA-kvetiapin og DM-mirtazapin. Konsentrasjonene til disse antipsykotika og antidepressiva er listet opp i tabell 2.1.

Tabell 2.1: Konsentrasjon (nM) til antipsykotika- og antidepressiva-standarder og kontroller.

Analytter	Standarder (nM)				Kontroller (nM)		
	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	QC 1	QC 2	QC 3
Klozapin	50,0	250	1500	5000	75,0	1000	4000
DM-klozapin	25,0	100	1000	2500	40,0	500	2000
Kvetiapin	10,0	100	1000	4000	15,0	500	3200
DA-kvetiapin	10,0	100	1000	3000	15,0	500	2400
Mirtazapin	10,0	100	750	1500	15,0	250	1200
DM-mirtazapin	5,0	50,0	200	500	7,5	75,0	400

2.2. Internstandard og utstyr

Som internstandard ble det brukt en ferdig laget oppløsning av deutererte versjoner av anti-psykotika og antidepressiva. Tabell 2.2 viser konsentrasjonen av komponentene i IS, oppgitt i ng/ml og i nM, som er blandet med 20% metanol i vann.

Tabell 2.2: Konsentrasjon av deuterert IS.

IS	Konsentrasjon (ng/ml)	Konsentrasjon (nM)
Klozapin-d ₈	100	299
DM-klozapin-d ₈	100	312
Kvetiapin-d ₈	240	823
DA-kvetiapin-d ₈	75,0	247
Mirtazapin-d ₃	50,0	186
DM-mirtazapin-d ₆	50,0	194

Tabell 2.3 viser en oversikt over utstyr som ble brukt under prøveopparbeidelse, separasjonen og deteksjonen av prøvematerialet i metoden.

Tabell 2.3: Utstyr som ble brukt under prøveopparbeidelse, separasjon og deteksjon.

Instrument	Modell	Produsent
Hamilton pipetteringsrobot (B)	Hamilton ML Star	Hamilton Robotics AB, Sveits
Pipettespisser til Hamilton	1000 µl u/filter	Hamilton Robotics AB, Sveits
PPP-modul til prøvefiltrering	Positive Pressure Processor	Waters, USA
Ostro 96-brønnsplate	Ostro™ 96-Well Plate 25 mg 1/pkg	Waters, USA
96-brønnsplate 2 ml	2 ml Square Well Collection Plate	Waters, USA
Forseglingsmatte for 2 ml 96-brønnsplate	Cap-mat square plags, silicone/PTFE treated, pre-slit	Waters, USA
Forkolonne	ACQUITY UPLC® HSS T3 VanGuard™ Pre-column, 2,1 x 5 mm, 1,8µm	Waters, USA
Analytisk kolonne	ACQUITY UPLC® HSS T3 2,1 x 100 mm, 1,8µm	Waters, USA
UPLC	AQUITY UPLC® I-class	Waters, USA
Detektor/MSMS	Xevo TQ-XS MS	Waters, USA
Instrument software, UPLC-MSMS	MassLynx V4.2	Waters, USA

2.3. Prøveopparbeidelse

Ved prøveopparbeidelse ble standarder/kontroller (konsentrasjoner i tabell 2.1, 50 µl) manuelt pipettert over i hvert sitt mikrorør, alle rør ble tilsatt IS (konsentrasjoner i tabell 2.2., 25 µl), og videre blandet med virvelmikser. Deretter ble det tilsatt iskald acetonitril (41,05M, 375 µl) til to mikrorør om gangen. Lokket til de to mikrorørene ble lukket og mikset umiddelbart på virvelmikser i 15 sekunder. Prøvene ble sentrifugert ved 11 000 RPM i 3 minutter.

Videre ble mikrorørene plassert i hvert sitt TT-rør (trombotest-rør), og ved hjelp av Hamilton pipetteringsrobot ble supernatanten (200 µl) i mikrorørene overført til en Ostro™-plate. Ostro™-platen ble flyttet til en Positive Pressure Processor (PPP-enhet) og ble plassert over en 96-dypbrønnsplate (analyseplaten) for filtrering. Analyseplaten ble satt under et trykk på ca. 6-8 bar i 2 minutter, og etter 2 minutter ble filtreringstrykket økt til ca. 10 bar i 1 minutt. Eluatet ble presset gjennom filteret i Ostro™-platen og ned i dypbrønnsplaten. Platen ble forseglet med matte og satt inn i UPLC-MSMS for analyse.

2.4. Analysebetingelser for UPLC

Tabell 2.4 viser hvilke analysebetingelser og instrumentinnstillinger for UPLC som ble benyttet.

Tabell 2.5 viser gradientprogram for UPLC. Dette viser hvordan sammensetningen av MF endrer seg over tid. Prøvene analyseres i intervaller på 2 minutter.

Tabell 2.4: Analysebetingelser og instrumentinnstillinger for UPLC

Injeksjonsvolum	0,6 µl
Kolonne-temperatur	50 °C
Autosample-temperatur	10 °C
Preinjeksjon vask	2 sek
Postinjeksjon vask	6 sek
Nålplassering	Automatisk
Mobilfase	Løsning A: 0,1 % FAc i H ₂ O Løsning B: ACN

Tabell 2.5: Gradientprogram for UPLC

Tid (min)	0,1 % FAc i H ₂ O (%)	ACN (%)	Flow (ml/min)	Kurve
Initial	85	15	0,6	Initial
1,00	70	30	0,6	6
1,35	60	40	0,6	6
1,70	2	98	0,6	1
2,00	75	25	0,6	1

2.5. Deteksjonsinnstillinger for MSMS

Tabell 2.6 viser instrumentinnstillinger for MSMS som ble benyttet under deteksjonen av antipsykotika og antidepressiva.

Tabell 2.6: Instrumentinnstillinger for MS og forventet retensjonstid (RT)

Positiv mode (ESI), MRM						
Stoff	Overgang (m/z)	Cone (V)	CE (eV)	Dwell-tid (sek)	RT (min)	IS
	Kvantifiseringsion					
Klozapin	327,1 > 270,1	47	30	0,021	1,66	Klozapin-d ₈
DM-klozapin	313,2 > 192,1	40	50	0,021	1,51	DM-klozapin-d ₈
Kvetiapin	384,2 > 221,1	32	35	0,021	1,76	Kvetiapin-d ₈
DA-kvetiapin	296,1 > 209,9	40	40	0,021	1,69	DA-kvetiapin-d ₈
Mirtazapin	266,2 > 72	42	24	0,046	1,20	Mirtazapin-d ₃
DM-mirtazapin	252,2 > 195,1	30	15	0,046	1,10	DM-mirtazapin- d ₆
Klozapin-d ₈	335,2 > 275,1	22	22	0,021	1,63	
DM-klozapin- d ₈	321,2 > 192,1	40	50	0,021	1,48	
Kvetiapin-d ₈	392,3 > 258,0	36	20	0,021	1,74	
DA-kvetiapin- d ₈	304,2 > 209,9	40	40	0,021	1,67	
Mirtazapin-d ₃	269,2 > 195,1	48	24	0,046	1,20	
DM- mirtazapin-d ₆	258,2 > 197,1	30	15	0,046	1,08	

2.6. Valideringsparametre og akseptkriterier

Signal til støy (S/N) - selektivitet og nedre deteksjonsgrense

S/N for Std1 i fullblod og Std1 i serum opparbeidet med fullblodsmetoden ble beregnet for alle analyttene, og sammenlignet med Std1 i den fullvaliderte metoden for serum. I tillegg ble kromatogrammene for Std1 i blod og serum sammenlignet, med tanke på interfererende topper. Denne sammenligningen ble brukt for å finne metodens kvantifiseringsgrense og undersøke om konsentrasjonsnivået til blod i fullblodsmetode må heves i forhold til serum i serummetode for å unngå mest mulig støy i kromatogrammet. Akseptkriterier $S/N \geq 30$. S/N-forholdet for Std1 for serum i fullblodsmetode ble sammenlignet med S/N for Std1 for serum i serummetode for å sjekke om S/N for de to metodene var i samme størrelsesorden eller høyere.

Vurdering av standardrekker, linearitet og kurvetilpasning

Vurdering av standardrekkene ble utført over tre dager, og ble basert på fire standardløsninger (Std1, Std2, Std3 og Std4) og tre kontroller (QC1, QC2 og QC3), med én parallell. Standarder og kontroller i fullblod ble kalibrert med serum-standardrekke. Det ble beregnet %avvik fra teoretisk verdi for hver av de tre dagene, som til slutt ble regnet ut som et gjennomsnittsavvik. Akseptkriterium ble satt til $\%avvik \leq 20\%$, og dersom alle avvik er innenfor kravet ville det kunne benyttes serum-standardrekke til kvantifisering av fullblodsprøver.

For å undersøke lineariteten til serum-standardkurven ble det benyttet fire standardløsninger, med tre paralleller på hvert nivå. Disse var jevnt fordelt over analyttens måleområde og ble utført på én dag. Lineariteten ble vurdert ved å undersøke avviket mellom målt verdi og teoretisk verdi for standarder med et krav på $\%bias \leq 20$. Korrelasjonskoeffisientene for serum- og blodrekkene ble vurdert opp mot kravet $R \geq 0,985$. Kurvetilpasningen som ble brukt i all kvantifisering gjennom hele valideringen var: kvadratisk, 1/x-vektning og exclude. Det var to akseptkriterier for den kvadratiske kurvetilpasningen. Det ene var at residualene var uavhengige og tilfeldig fordelt omkring det horisontale null (regresjonslinjen). Det andre var at gjennomsnittsmålingene for hver konsentrasjon av de tre parallellene lå innenfor [90 %, 110%] av teoretisk verdi.

Repeterbarhet

Repeterbarhet ble undersøkt på kontroller i både fullblod og serum. Det ble kun brukt serumstandarder ettersom S/N og linearitet var godkjent før gjennomføring. Repeterbarhet krever at opparbeidelsen utføres av én og samme analytiker, og at det kjøres mange paralleller i samme oppsett. Det ble brukt seks paralleller av både QC1, QC2 og QC3, og opparbeidelsen ble utført av samme person, samme dag. Akseptkriterier ble satt til $CV \leq 10\%$.

Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarheten ble undersøkt på kontroller i både fullblod og serum. Som standardrekke ble det brukt serum ettersom serumstandardrekke var godkjent før gjennomføring av reproduserbarhet. Det ble brukt to ulike konsentrasjoner av QC-løsninger for å undersøke metodens reproduserbarhet og nøyaktighet. I dette oppsettet ble det brukt QC1 og QC3, noe som gir mulighet for å undersøke både høye og lave verdier i måleområdet. Opparbeidelsen ble utført av tre personer i ulike oppsett over seks dager for å undersøke presisjon under varierende betingelser. Akseptkriterier ble satt til $CV \leq 15\%$ og $\%bias \leq 15\%$.

Holdbarhet autosamplere

For å undersøke holdbarheten på prøvene etter prøveoppbevaring sjekkes QC1 og QC3. Det ble analysert tre paralleller, som ble analysert ved dag 0, dag 3 og dag 5. Som standard protokoll oppbevares prøvene i dypbrønnplaten i en uke før de kastes. QC1 og QC3 ble reinjisert på samme instrument fra denne platen etter tre og fem dager for å undersøke eventuelle endringer. Platen ble lagret ved 10°C , som er temperaturen i analyseinstrumentets autosampler, og derfor den høyeste mulige lagringstemperaturen. Akseptkriteriene ble satt til $CV \leq 15\%$ og relativt avvik i $\% \leq 15\%$.

3. Resultater og diskusjoner

3.1. Nedre kvantifiseringsgrense

For å bestemme metodens nedre kvantifiseringsgrense og å undersøke om det var mulig å benytte samme konsentrasjonsnivå i serum for bestemmelse av antipsykotika, antidepressiva og deres metabolitter i fullblod, ble signal-støy-forholdet (S/N) undersøkt for Std1.

S/N-forholdet til blod i fullblodsmetode ble sammenlignet med S/N-forholdet til serum i serummetode. Kromatogrammene til blod i fullblodsmetode ble undersøkt for interfererende toppler og sammenlignet med kromatogrammene til serum i serummetode.

Det ble beregnet S/N-forhold for serum opparbeidet som fullblodsmetode og sammenlignet med S/N-forhold for serum i serummetode.

Resultatene for S/N-forholdene kan sees i tabell 3.1-1.

Tabell 3.1-1: S/N for Std1 analysert med de to metodene, serum og fullblod.

	S/N serum (serummetode)	S/N serum (fullblodmetode)	S/N blod (fullblodmetode)
Klozapin	4800	1795	345
DM-Klozapin	499	260	203
Kvetiapin	530	384	131
DA-Kvetiapin	350	302	136
Mirtazapin	854	86	70
DM-Mirtazapin	167	108	51

S/N-kromatogram for antipsykotika og antidepressiva er vedlagt i vedlegg 2, vedlegg 3 og vedlegg 4.

S/N-forholdene for serum og blod i fullblodsmetode ligger lavere enn for serum i serummetode, men alle verdiene er innenfor kravet, $S/N \geq 30$. Serum og blod i fullblodsmetode for mirtazapin og DM-mirtazapin har lavere S/N-forhold enn de har for serum i serummetode. Forskjellen kan skyldes at mirtazapin og DM-mirtazapin har lavere konsentrasjoner, slik at toppene ligger

nærmere x-aksen. Dette fører til at forholdet mellom støy og signal vil være mindre enn ved høyere konsentrasjoner. Likevel interferer ikke støyet med analyttens topper, og de lave S/N-verdiene kan godkjennes.

Sammenligningen av S/N-forholdet av serum i serummetode og serum i fullblodsmetode viser at serum i fullblodsmetode er i en lavere størrelsesorden for mirtazapin enn for serum i fullvalidert serummetode. Dette kan skyldes støy fra komponenter som ikke finnes i serum, men i fullblod.

Verdiene for antipsykotika og antidepressiva er lavere i fullblodsmetoden sammenlignet med serummetoden, men resultatene tilsier at serum og blod i fullblodsmetoden er innenfor S/N-kravet på ≥ 30 , og derfor kan blod i fullblodsmetoden benytte samme konsentrasjonsnivå av antipsykotika og antidepressiva som serum i serummetoden. Nedre kvantifiseringsgrense vil være det samme som ved validert serummetode, ettersom S/N-forholdene er innenfor kravet på $S/N \geq 30$.

3.2. Linearitet og kurvetilpasning

Det ble undersøkt om serum-standardkurve for antipsykotika, antidepressiva og metabolitter kan brukes til analyse av fullblod fra postmortale prøver. Dette ble gjort ved at standarder og kontroller fra fullblod ble kalibrert med en serum-standardkurve over tre dager. De målte verdiene ble deretter sammenlignet med teoretiske verdier, og det ble beregnet %avvik for hver dag og et gjennomsnittsavvik for de tre dagene. Tabell 3.2-1 viser verdiene som ble benyttet for å vurdere om serum-standardrekken kunne erstatte en fullblod-standardrekke.

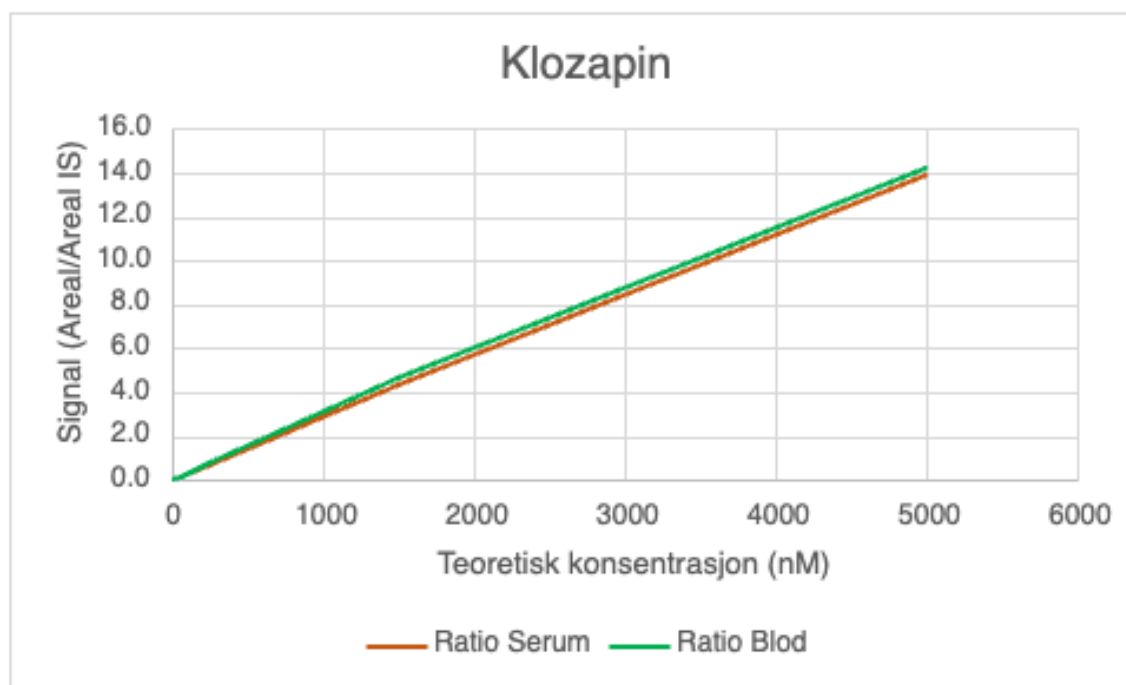
Tabell 3.2-1: Beregnet gjennomsnittlig avvik fra teoretisk verdi i målt konsentrasjon i fullblod.

Analytt	Teoretisk verdi (nM)		Gjennomsnittlig konsentrasjon fra tre dager (nM)	Gjennomsnittlig avvik (%)
	Std1	Std2		
Klozapin	Std1	50	54,6	9,2
	Std2	250	257,2	2,9
	Std3	1500	1587,5	5,8
	Std4	5000	5201,3	4,0

	QC1	75	83,1	10,8
	QC2	1000	1048,5	4,9
	QC3	4000	4270,6	6,8
DM-Klozapin	Std1	25	26,5	6,1
	Std2	100	101,8	1,8
	Std3	1000	1037,7	3,8
	Std4	2500	2594,0	3,8
	QC1	40	42,4	6,1
	QC2	500	509,9	2,0
	QC3	2000	2040,0	2,0
Kvetiapin	Std1	10	11,0	10,3
	Std2	100	104,3	4,3
	Std3	1000	1062,4	6,2
	Std4	4000	4143,4	3,6
	QC1	15	17,1	13,8
	QC2	500	537,6	7,5
	QC3	3200	3482,6	8,8
DA-Kvetiapin	Std1	10	10,4	4,1
	Std2	100	104,1	4,1
	Std3	1000	1046,2	4,6
	Std4	3000	3108,8	3,6
	QC1	15	16,6	10,3
	QC2	500	528,2	5,6
	QC3	2400	2538,7	5,8
Mirtazapin	Std1	10	10,4	3,5
	Std2	100	104,0	4,0
	Std3	750	771,7	2,9
	Std4	1500	1561,7	4,1
	QC1	15	15,9	5,7
	QC2	250	250,7	0,3
	QC3	1200	1213,1	1,1

DM-Mirtazapin	Std1	5	5,3	5,9
	Std2	50	52,5	5,1
	Std3	200	209,8	4,9
	Std4	500	524,5	4,9
	QC1	7,5	8,2	9,8
	QC2	75	78,6	4,8
	QC3	400	420,3	5,1

Rådata for beregningene er vist i vedlegg 5.



Figur. 3.2-1. Kalibreringskurve for klozapin i serum og blod.

Figur 3.2-1 viser kalibreringskurven for klozapin i serum- og blod-matrikser sammenfallende. Resten av kalibreringskurvene til antipsykotika og antidepressiva kan ses i vedlegg 6.

Resultatene fra tabell 3.2-1 viser at alle de gjennomsnittlige avvikene er godt innenfor akseptkriteriet på $\leq 20\%$. Både kalibreringskurven for klozapin i serum og blod i figur 3.2-1 og verdiene fra tabellen 3.2-1 viser en trend hvor avvikene ligger høyere enn teoretisk verdi. Dette kan skyldes at serum består av færre komponenter enn fullblod, og matrikseffekten i fullblod kan komme til uttrykk. Selv om det observeres en svak trend, ligger alle verdiene godt innenfor kriteriene. Derfor kan serum-standarder benyttes for kvantifisering av antipsykotika,

antidepressiva og metabolitter i fullblodsprøver. I praksis innebærer dette at laboratoriet slipper å tillage egne standardrekker i fullblod, noe som fører til mindre arbeid og mindre avfall.

Standardkurvenes linearitet ble undersøkt ved å se på korrelasjonskoeffisientene (R) for hver antipsykotika og antidepressiva. Det ble analysert tre paralleller i fire forskjellige konsentrasjonsnivå. R-verdiene ble hentet fra lineær kurvetilpasning for standardkurvene, og videre ble lineariteten vurdert visuelt med kvadratisk kurvetilpasning. Grafisk framstilling av standardkurvene og residualene er vedlagt i vedlegg 7. Tabell 3.2-2 viser verdier for serum-standardkurve med bias og CV. Tabell 3.2-3 viser antipsykotika og antidepressiva sine korrelasjonskoeffisienter (R).

Tabell 3.2-2: Presisjon som CV og nøyaktighet som bias bestemt for linearitet i serum-standardkurve.

Analytt	Teoretisk verdi (nM)		Gjennomsnittlig konsentrasjon (n=3) (nM)	Bias (%)	CV (%)
	Std1	Std2			
Klozapin	Std1	50	49,8	-0,4	0,6
	Std2	250	253,8	1,5	2,0
	Std3	1500	1517,0	1,1	1,7
	Std4	5000	4999,3	0,0	2,8
DM-Klozapin	Std1	25	25,0	-0,3	1,6
	Std2	100	97,8	-2,2	1,9
	Std3	1000	987,5	-1,3	1,1
	Std4	2500	2485,0	-0,6	0,6
Kvetiapin	Std1	10	10,3	2,8	2,6
	Std2	100	100,4	0,4	0,4
	Std3	1000	1004,1	0,4	0,8
	Std4	4000	3924,3	-1,9	2,9
DA-Kvetiapin	Std1	10	9,8	-2,3	1,9
	Std2	100	100,1	0,1	1,9

	Std3	1000	1015,6	1,6	2,7
	Std4	3000	3032,5	1,1	1,9
Mirtazapin	Std1	10	10,0	-0,5	3,8
	Std2	100	102,5	2,5	2,7
	Std3	750	750,0	0	1,7
	Std4	1500	1512,9	0,9	1,7
DM-Mirtazapin	Std1	5	5,1	1,6	2,7
	Std2	50	50,1	0,2	2,0
	Std3	200	203,5	1,7	2,1
	Std4	500	497,2	-0,6	0,6

n=antall paralleller

Rådata for beregningene er vist i vedlegg 8.

Tabell 3.2-3: Korrelasjonskoeffisienter fra lineær kurvetilpasning til serum-standardkurve.

	Måleområde (nM)	Korrelasjonskoeffisient
Klozapin	50-5000	0,9996
DM-Klozapin	25-2500	0,9997
Kvetiapin	10-4000	0,9997
DA-Kvetiapin	10-3000	0,9997
Mirtazapin	10-1500	1,0000
DM-Mirtazapin	5-500	0,9999

Tabell 3.2-3 viser at alle standardkurvene har $R > 0,985$, og innfrir dermed kravet ($R \geq 0,985$).

Dette betyr at alle standardene har god linearitet. At metoden har god linearitet innebærer at signalet som registreres av detektoren er tilnærmet proporsjonalt med konsentrasjonen, og derfor kan prøvenes konsentrasjon gis ut med god sikkerhet.

Residualplottene, se vedlegg 7, viser at alle residualene er uavhengige av hverandre og er godt fordelt i plottet. Godt fordelte residualer tyder på at det ikke er store avvik fra den lineære

modellen. Verdiene fra tabell 3.2-2 viser at gjennomsnittet av målingene ligger innenfor [90%, 110%] av teoretisk verdi. Residualene og gjennomsnitt av standardparallelene er innenfor akseptkriteriene for analysens kurvetilpasning.

3.3. Repeterbarhet

Repeaterbarheten ble undersøkt på kontroller i både serum og fullblod. I tabell 3.3-1 og 3.3-2 er det oppført gjennomsnittlig målt verdi og beregnet %CV for de seks parallelene i henholdsvis serum og fullblod. De står oppført etter analytt og QC-konsentrasjon. Kravet til repeaterbarhet for denne metoden er $\%CV \leq 10\%$.

Tabell 3.3-1: Presisjon som CV ved bestemmelse av repeaterbarhet i serum

Analytt		Teoretisk verdi (nM)	Gjennomsnittlig konsentrasjon (nM)	CV (%)
Klozapin	QC1	75	77,4	1,7
	QC2	1000	1016,7	2,2
	QC3	4000	4046,5	1,7
DM-Klozapin	QC1	40	42,3	1,1
	QC2	500	510,8	1,1
	QC3	2000	1991,9	1,5
Kvetiapin	QC1	15	16,3	2,9
	QC2	500	526,9	1,6
	QC3	3200	3338,3	1,6
DA-Kvetiapin	QC1	15	16,3	1,6
	QC2	500	518,8	1,3
	QC3	2400	2446,2	1,6
Mirtazapin	QC1	15	15,2	3,4
	QC2	250	247,1	1,2
	QC3	1200	1180,3	2,0
DM-Mirtazapin	QC1	8	7,6	2,3
	QC2	75	78,2	2,1
	QC3	400	413,9	1,2

Tabell 3.3-2: Presisjon som utregnet CV ved bestemmelse av repeterbarhet i fullblod

Analytt		Teoretisk verdi (nM)	Gjennomsnittlig konsentrasjon (nM)	CV (%)
Klozapin	QC1	75	82,8	3.0
	QC2	1000	1090,3	1.1
	QC3	4000	4469,8	1.2
DM-Klozapin	QC1	40	44,1	1.4
	QC2	500	541,0	1.4
	QC3	2000	2107,3	1.6
Kvetiapin	QC1	15	17,6	2.1
	QC2	500	562,8	1.8
	QC3	3200	3515,8	2.7
DA-Kvetiapin	QC1	15	17,1	2.7
	QC2	500	550,1	2.1
	QC3	2400	2581,1	1.2
Mirtazapin	QC1	15	15,8	1.2
	QC2	250	257,8	1.5
	QC3	1200	1236,8	2.4
DM-Mirtazapin	QC1	7,5	8.0	2.0
	QC2	75	84.2	1.0
	QC3	400	444,0	1.8

Alle verdier for %CV er innenfor kravet og det observeres ingen vesentlige forskjeller mellom blodmatriks og serummatris. Ingen verdier overstiger 4,0% noe som er under halvparten av det fastsatte akseptkriteriet. Dette innebærer liten variasjon i verdiene innenfor samme serie, og at prøvesvar kan stoles på fordi analysen ikke gir store avvik når samme prøve opparbeides flere ganger. Dette betyr at metodens presisjon er god og at den har lite tilfeldige feil.

3.4. Reproduserbarhet og nøyaktighet

Reproduserbarhet og nøyaktighet ble testet over seks dager og gjennomsnittlig verdi fra alle dagene vises under i tabell 3.4-1 for serum og 3.4-2 for fullblod. Tabellene viser også utregnet %CV som et mål på reproduserbarheten, og nøyaktigheten oppgis som %bias. Alle verdiene for %CV er godt innenfor kravet på $\leq 15\%$, med varierende verdier fra 1,9% til 5,7%. %bias har verdier som varierer fra $-1,6\%$ helt opp til $15,0\%$, men også her er alle verdiene innenfor kravet på $\leq 15\%$.

Tabell 3.4-1: Presisjon som CV og nøyaktighet som bias ved bestemmelse av reproduserbarhet i serum

Analytt		Teoretisk verdi (nM)	Gjennomsnittlig konsentrasjon (nM)	CV (%)	Bias (%)
Klozapin	QC1	75	79,47	3,3	6,0
	QC3	4000	4140,80	4,4	3,5
DM-Klozapin	QC1	40	41,45	3,3	3,6
	QC3	2000	1968,30	2,1	-1,6
Kvetiapin	QC1	15	16,32	3,3	8,8
	QC3	3200	3358,48	5,7	5,0
DA-Kvetiapin	QC1	15	16,39	3,1	9,2
	QC3	2400	2449,37	2,0	2,1
Mirtazapin	QC1	15	15,41	3,7	2,7
	QC3	1200	1180,83	2,7	-1,6
DM-Mirtazapin	QC1	7,5	8,18	2,7	9,0
	QC3	400	409,96	2,1	2,5

Tabell 3.4-2: Presisjon som CV og nøyaktighet som bias ved bestemmelse av reproduserbarhet i fullblod

Analytt		Teoretisk verdi (nM)	Gjennomsnittlig konsentrasjon (nM)	CV (%)	Bias (%)
Klozapin	QC1	75	81,8	2,7	9,0
	QC3	4000	4304,6	3,5	7,6
DM-Klozapin	QC1	40	42,6	3,4	6,6
	QC3	2000	2052,1	2,9	2,6
Kvetiapin	QC1	15	17,3	2,6	15,0
	QC3	3200	3474,1	2,8	8,6
DA-Kvetiapin	QC1	15	16,6	3,3	10,9
	QC3	2400	2525,3	1,8	5,2
Mirtazapin	QC1	15	15,8	2,7	5,2
	QC3	1200	1207,9	4,0	0,7
DM-Mirtazapin	QC1	7,5	8,2	2,4	8,8
	QC3	400	422,6	3,7	5,7

Presisjon som %CV er for alle analytter og metabolitter innenfor satte akseptkriterier, og verdiene varierer opp til 5,7%. Alle verdier for %bias er også innenfor kravet på $\leq 15\%$, men her varierer verdiene fra $-1,6\%$ til $15,0\%$. %bias ligger jevnt over lavere i serum enn fullblod. Dette kan skyldes at fullblod består av flere komponenter enn serum, noe som kan gi økt ionisering og falskt forhøyede svar. Det er også forskjeller i avvik mellom QC1 og QC3. Det er lettere at lavere konsentrasjoner får dårligere riktighet, siden det er lavere tall, og vil bli påvirket mer av unøyaktighet i f.eks. måling. 1 nM i forskjell mellom teoretisk og målt konsentrasjon vil altså påvirke QC1 mye mer enn QC3.

3.5. Holdbarhet autosampler

Ved undersøkelse av holdbarhet ble prøvene fra dypbrønnsplata reinjisert i instrumentet etter tre og fem dager. Tabell 3.5-1 viser gjennomsnitt av tre paralleller for QC1 og QC3 ved dag 0, dag 3 og dag 5. I tillegg viser tabellen avviket mellom dag 0 og dag 3, og dag 0 og dag 5, og CV (%) på hvert konsentrasjonsnivå.

Tabell 3.5-1: CV (%) og endring uttrykt som %avvik mellom dag 0 - dag 3 og dag 0 - dag 5 ved bestemmelse av holdbarhet.

Gj.kons = Gjennomsnittlig konsentrasjon

Analytt		Teoretisk verdi (nM)	Gjennomsnitt dag 0	CV (%)	Gjennomsnitt dag 3	CV (%)	Gjennomsnitt dag 5	CV (%)	Avvik Dag 0-Dag 3 (%)	Avvik Dag 0-Dag 5 (%)
Klozapin	QC1	75	79,5	2,5	81,9	1,0	80,8	1,7	3,0	1,7
	QC3	4000	4286,2	1,3	4329,1	1,5	4414,9	6,6	1,0	3,0
DM-Klozapin	QC1	40	40,6	1,1	42,1	0,3	41,4	0,5	3,6	1,8
	QC3	2000	2029,4	0,5	2023,7	1,2	2035,0	2,2	-0,3	0,3
Kvetiapin	QC1	15	16,3	1,7	16,8	1,7	16,1	2,6	2,9	-1,3
	QC3	3200	3341,2	2,6	3332,0	3,6	3546,8	2,9	-0,3	6,2
DA-Kvetiapin	QC1	15	15,3	0,8	16,3	0,3	16,2	1,2	6,0	5,5
	QC3	2400	2491,9	0,4	2510,4	1,8	2497,6	2,2	0,7	0,2
Mirtazapin	QC1	15	16,0	3,5	15,3	1,0	15,7	1,7	-4,5	-2,0
	QC3	1200	1179,1	0,5	1202,0	0,5	1213,4	0,9	1,9	2,9
DM-Mirtazapin	QC1	7.5	7,8	1,9	8,0	0,4	7,9	2,1	2,1	1,2
	QC3	400	428,0	1,7	433,5	1,5	430,1	0,6	1,3	0,5

Tabell 3.5-1 viser at verdiene mellom dag 0 og dag 3, og dag 0 og dag 5 ikke overstiger akseptkriteriene. Alle verdier for %CV er innenfor kravet på $\leq 15\%$, og verdiene varierer fra 0,5% til 6,6%. Resultatene fra %avvik er innenfor kravet på $\leq 15\%$, og her varierer verdiene fra -4,5% til 6,0%. Dette betyr at prøver lagret i dypbrønnsplaten ved 10°C kan reinjiseres på instrumentet opp til fem dager etter prøveopparbeidelse dersom de må testes på nytt.

4. Konklusjon

Metodens linearitet og kurvetilpasning ble undersøkt. Resultatene viser god linearitet, og de to metodene har nesten sammenfallende kurver. Standardkurvenes korrelasjonskoeffisienter er alle innenfor kravene ($R \geq 0,985$), og residualplottene viser ingen store avvik. Derfor kan det konkluderes med at standarder og kontroller i serummatriks kan benyttes ved analyse av fullblodsprøver. I tillegg ble S/N og selektivitet for Std1 undersøkt. Her viser resultatene ulike S/N-forhold, men både S/N-forholdet for blod- og serummatriks i fullblodsmetoden er innenfor kravene på $S/N \geq 30$. Derfor kan en konkludere med at nedre kvantifiseringsgrense for fullvalidert metode i serum kan brukes som nedre kvantifiseringsgrense i metoden for fullblod.

Holdbarheten for metoden etter prøveopparbeidelse ble også undersøkt. Dette ble gjort ved å se på avvik mellom dag0-dag3 og dag0-dag5 og %CV i oppbevaring ved 10°C. Avvik mellom dagene hadde et krav på $\leq 15\%$, og %CV hadde et krav på $\leq 15\%$. Resultatene viste at alle verdiene var innenfor akseptkriteriene.

For å kunne avgjøre om metoden i fullblod er egnet for kvantifisering av antipsykotika, antidepressiva og deres metabolitter ble repeterbarhet, reproduserbarhet og nøyaktighet undersøkt. Parameterne ble undersøkt som %CV og bias. Repeterbarheten hadde et %CV krav på $\leq 10\%$ og reproduserbarhet hadde %CV krav på $\leq 15\%$. Alle verdier havnet innenfor disse kravene. Nøyaktigheten viste også tilfredsstillende resultater da ingen verdier oversteg biaskravet på $\leq 15\%$.

Undersøkelsen viser at antipsykotika (klozapin, kvetiapin), antidepressiva (mirtazapin) og deres metabolitter (DM-klozapin, DA-kvetiapin, DM-mirtazapin) kan kvantifiseres i postmortale fullblodsprøver med serummatriks som standard. Holdbarheten til opparbeidede prøver er satt til fem dager ved lagring i 10°C.

5. Referanser

1. Malt U, Moen SH. klozapin. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 12. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/klozapin>
2. L5.2.4.4 Klozapin | Legemiddelhåndboka [Internett]. 2022 [sitert 24. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L5.2.4.4/Klozapin>
3. Afshar A. Kvetiapin. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 12. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/kvetiapin>
4. L5.2.4.5 Kvetiapin | Legemiddelhåndboka [Internett]. 2023 [sitert 24. april 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L5.2.4.5/Kvetiapin>
5. L5.3.7.2 Mirtazapin | Legemiddelhåndboka [Internett]. [sitert 23. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.legemiddelhandboka.no/L5.3.7.2/Mirtazapin>
6. Terapeutisk indeks – Store medisinske leksikon [Internett]. [sitert 12. april 2023]. Tilgjengelig på: https://sml.snl.no/terapeutisk_indeks
7. Hendset M, Hermann M. Hvorfor måle legemiddelmetabolitter? Tidsskr Den Nor Legeforening [Internett]. 28. juni 2007 [sitert 11. mai 2023]; Tilgjengelig på: <https://tidsskriftet.no/2007/06/legemidler-i-praksis/hvorfor-male-legemiddelmetabolitter>
8. Panuwet P, Hunter RE, D'Souza PE, Chen X, Radford SA, Cohen JR, mfl. Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. Crit Rev Anal Chem. 3. mars 2016;46(2):93–105.
9. Hansen SH, Pedersen-Bjergaard S. Bioanalysis of Pharmaceuticals - Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry. 1. edition. Storbritannia: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
10. Evensen SA. Blodserum. I: Store medisinske leksikon [Internett]. 2023 [sitert 15. mai 2023]. Tilgjengelig på: <https://sml.snl.no/blodserum>
11. Frequently Asked Questions: Sample Preparation [Internett]. [sitert 27. mars 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.restek.com/row/frequently-asked-questions-faqs/frequently-asked-questions-sample-preparation/>
12. Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 8. edition. USA: Elsevier; 2019.
13. Lundanes E, Reubsæet L, Greibrokk T. Chromatography - Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods. 1. edition. Weinheim, Tyskland: Wiley-VHC; 2014.
14. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. Kromatografi: separasjon og deteksjon. 3. utgave. Oslo: Universitetsforlaget AS; 1994.
15. Xevo TQ-S Operation and Maintenance Training. USA: Waters Corporation; 2011.

16. Arnaud CH. As the triple quadrupole turns 40, mass spec gurus look back on what it's meant to chemistry. I 2018. Tilgjengelig på: <https://cen.acs.org/articles/96/i10/triple-quadrupole-turns-40-mass.html>
17. Gross JH. Mass Spectrometry. 1. edition. Berlin: Springer; 2004.
18. Grumbach ES, Arsenault JC, McCabe DR. Beginners Guide to ultra-performance liquid chromatography. USA: Waters Corporation; 2012.
19. Hegstad, S A TN. AKF Metodeutvikling, validering, implementering og evaluering - analytisk FoU [Internett]. St. Olavs Hospital; 2022. Tilgjengelig på: <http://eqsstolav.helsemn.no/index.pl?pid=stolav&DocumentID=26409>
20. Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll. Validering / Verifisering av klinisk kjemiske analyser [Internett]. Norsk Klinisk-Kjemisk Kvalitetskontroll; 2002. Tilgjengelig på: http://doc.noklus.no/handler.ashx?r=nkk&id=Val_NKK.pdf
21. Thoresen TS. Statistikk for laboratoriet. 2. utgave. Tromsø: Lundblad Media AS; 2011.
22. Gunderson, P. O. M. AKF KloQuM i serum valideringsplan [Internett]. St. Olavs Hospital; 2023. Tilgjengelig på: <http://eqsstolav.helsemn.no/index.pl?pid=stolav&DocumentID=46256>

6. Vedlegg

Vedlegg 1: Flytskjema prøveopparbeidelse	s. 37
Vedlegg 2: Std1 – serum i serummetode kromatogrammer med S/N beregning	s. 38
Vedlegg 3: Std1 – serum i fullblodsmetode kromatogrammer med S/N beregning	s. 39
Vedlegg 4: Std1 – blod i fullblodsmetode kromatogrammer med S/N beregning	s. 40
Vedlegg 5: Konsentrasjoner for Std- og QC-fullblodsprøver kalibrert med serum-standardkurve	s. 41
Vedlegg 6: Kalibreringskurve for antipsykotika, antidepressiva og metabolitter	s. 44
Vedlegg 7: Standardkurver og residualene (%)	s. 47
Vedlegg 8: Konsentrasjoner for serum-standardkurve (linearitet)	s. 50
Vedlegg 9: Korrelasjonskoeffisienter	s. 52

Vedlegg 1: Flytskjema prøveopparbeidelse

TIL BACHELOR VÅREN 2023 Flytskjema KLOQUM FULLBLOD

Pipetter 50 µl standard/kontroll over i mikrorør
Vi benytter standarder og kontroller i serum
Prøver er ferdig innveid i mikrorør



Tilsett 25 µl Kloquim-I.S
(20% MeOH i H₂O)
Bland forsiktig på whirlmikser (2-3 s)



Tilsett 375 µl ACN (iskald, rett fra fryser) i to mikrorør av gangen,
Kork og miks umiddelbart på whirlmikser i ca. 15 s



Sentrifuger ved 11000 rpm i 3 min på Hettich sentrifuge *SAMME VEI!*



Sett mikrorørene i tt-rør for pipettering på Hamilton *blockkavt mot venstre*

Beskrivelse	Prøve/reagenser/ utstyr	Volum	Posisjon Hamilton
Prøveblanding	Std/QC (mikrorør i tt-rør)	200 µl	Spor 46, pos 1-8
	Prøver (mikrorør i tt-rør)	200 µl	Spor 49 - 50
Filtreringsplate	Ostro™ 96- brønnsplate		Spor 39, pos 4 Plasseres oppå en mikrotiterplate
Engangsspisser	MiStar 1000 µl standard volum spiss <i>uten</i> filter		Spor 21 og 27, pos 1

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

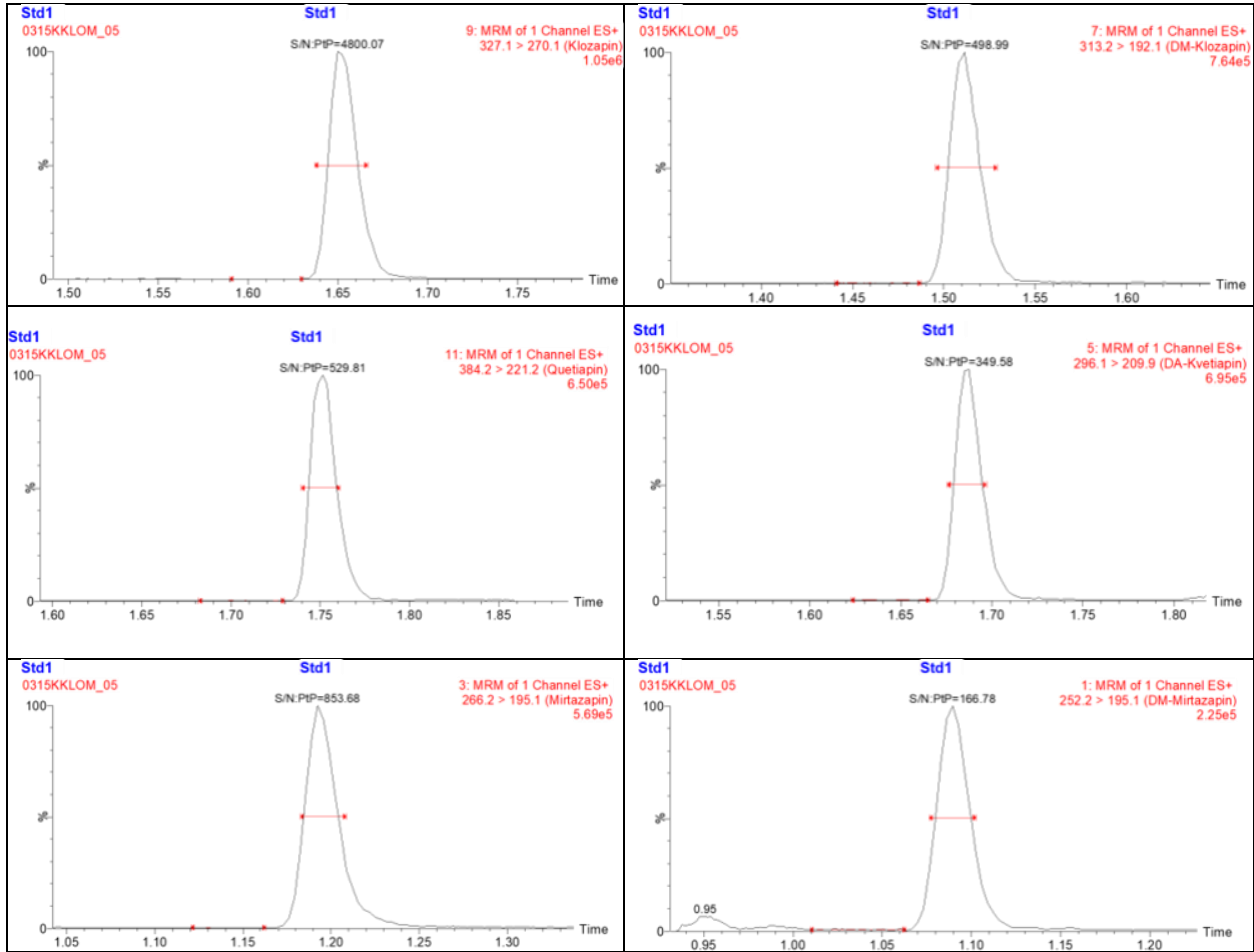


PPP - *egen oppskrift*

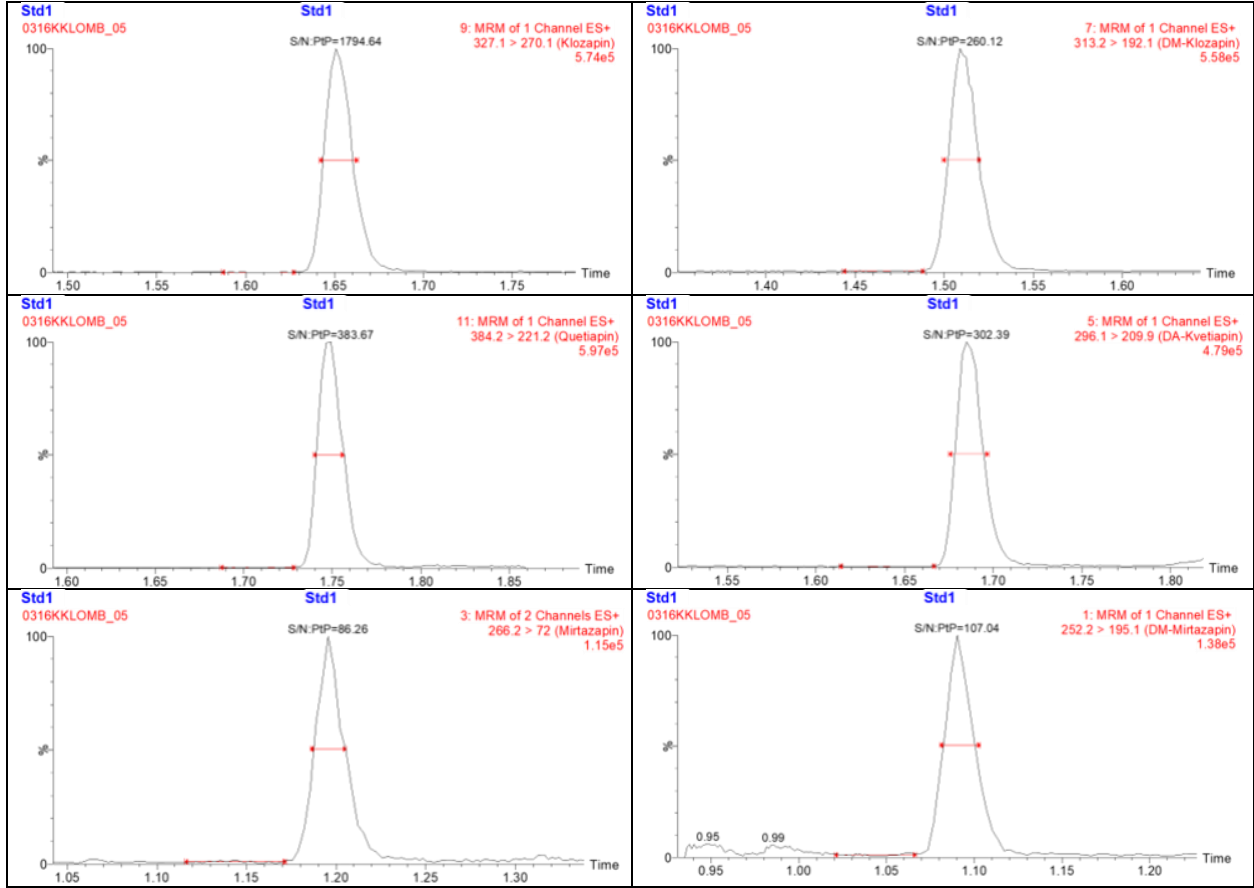


Settes i autosampler på LC-MSMS (10°C) for analyse

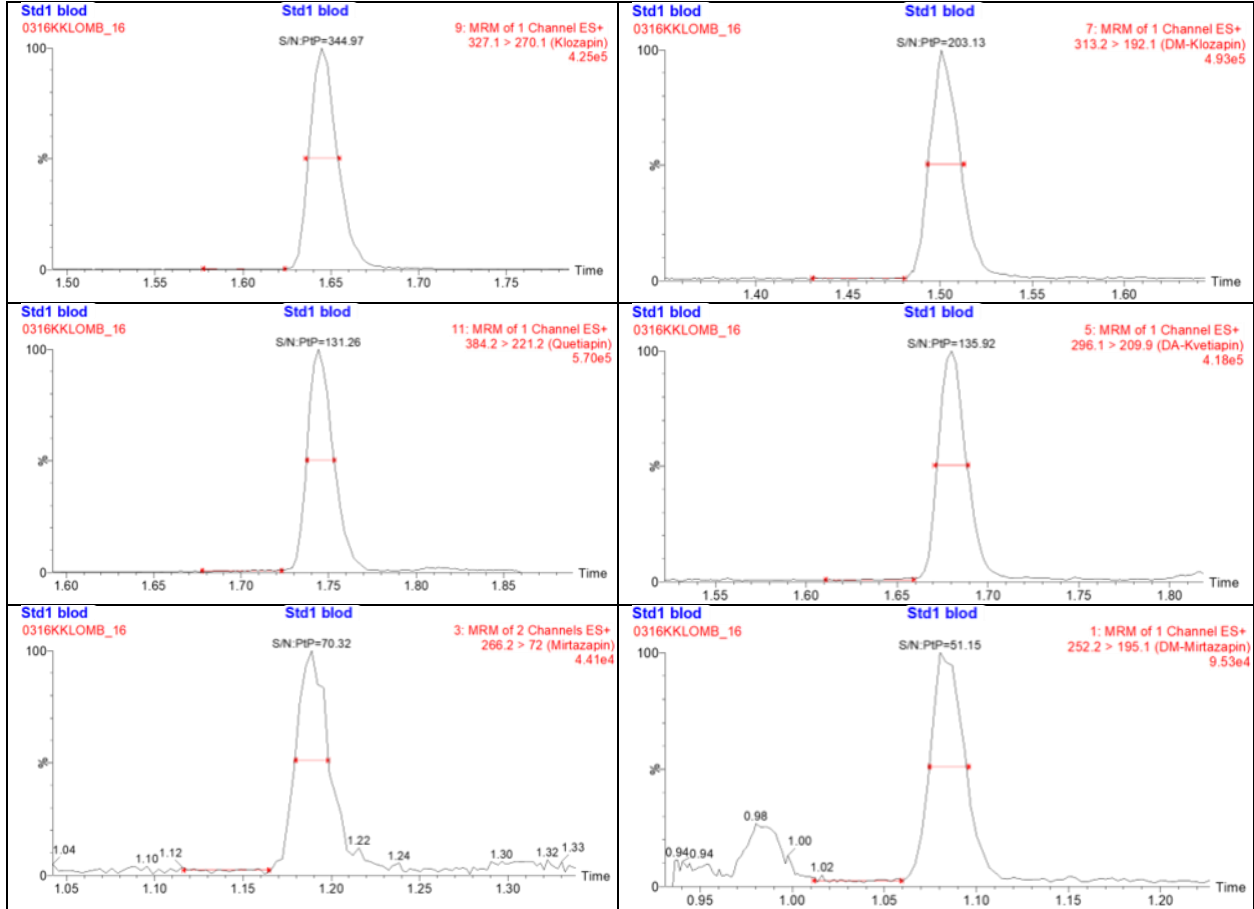
Vedlegg 2: Std1 - serum i serummetode kromatogrammer med S/N beregning



Vedlegg 3: Std1 – serum i fullblodsmetode kromatogrammer med S/N beregning



Vedlegg 4: Std1 – blod i fullblodsmetode kromatogrammer med S/N beregning



Vedlegg 5: Konsentrasjoner for standard- og kontrollfullblodsprøver kalibrert med serum-standardkurve.

Klozapin								
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	50	53.4	6.7%	56.0	12.1%	54.4	8.7%	9.2
Std2	250	258.0	3.2%	252.2	0.9%	261.3	4.5%	2.9
Std3	1500	1,599.2	6.6%	1524.9	1.7%	1638.3	9.2%	5.8
Std4	5000	5,151.8	3.0%	5349.4	7.0%	5102.8	2.1%	4.0
QC1	75	84.8	13.1%	83.7	11.6%	80.8	7.7%	10.8
QC2	1000	1,093.3	9.3%	1033.8	3.4%	1018.5	1.9%	4.9
QC3	4000	4,362.5	9.1%	4369.2	9.2%	4080.1	2.0%	6.8
DM-Klozapin								
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	25	25.6	2.5%	27.8	11.2%	26.1	4.5%	6.1
Std2	100	100.6	0.6%	103.7	3.7%	101.1	1.1%	1.8
Std3	1000	1,046.0	4.6%	1050.2	5.0%	1016.8	1.7%	3.8
Std4	2500	2,587.2	3.5%	2573.6	2.9%	2621.2	4.8%	3.8
QC1	40	42.1	5.2%	43.8	9.6%	41.4	3.4%	6.1
QC2	500	529.4	5.9%	508.4	1.7%	492.0	-1.6%	2.0
QC3	2000	2,090.9	4.5%	2033.2	1.7%	1995.7	-0.2%	2.0
Kvetiapin								

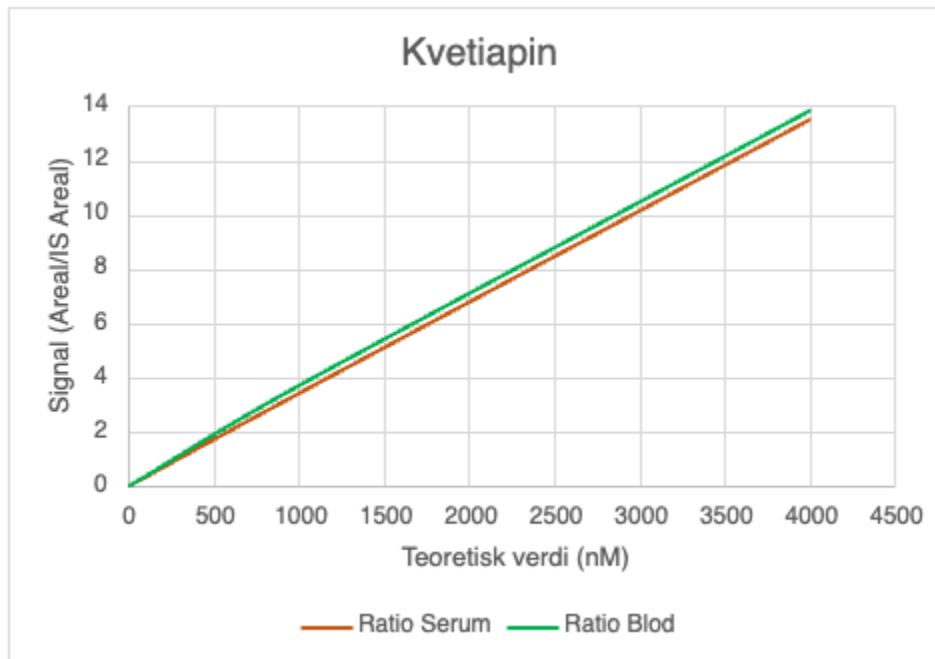
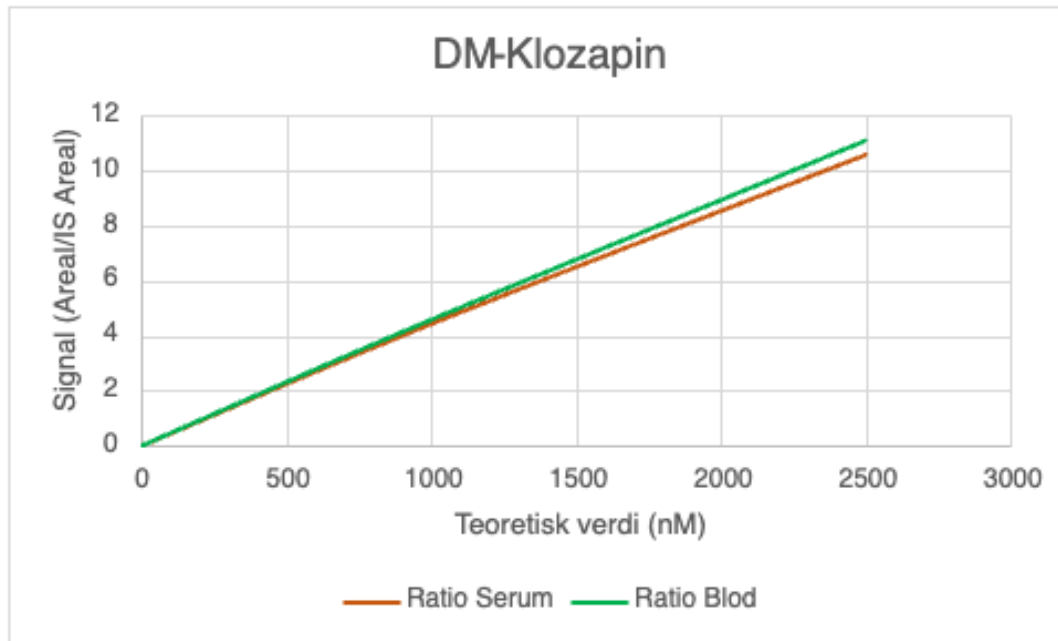
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	10	10.7	7.3%	11.3	13.0%	11.1	10.7%	10.3
Std2	100	104.2	4.2%	100.9	0.9%	107.8	7.8%	4.3
Std3	1000	1,053.1	5.3%	1050.0	5.0%	1084.2	8.4%	6.2
Std4	4000	4,078.5	2.0%	4252.6	6.3%	4099.1	2.5%	3.6
QC1	15	16.7	11.3%	17.2	14.7%	17.3	15.3%	13.8
QC2	500	534.0	6.8%	534.3	6.9%	544.6	8.9%	7.5
QC3	3200	3,417.6	6.8%	3604.7	12.6%	3425.6	7.0%	8.8

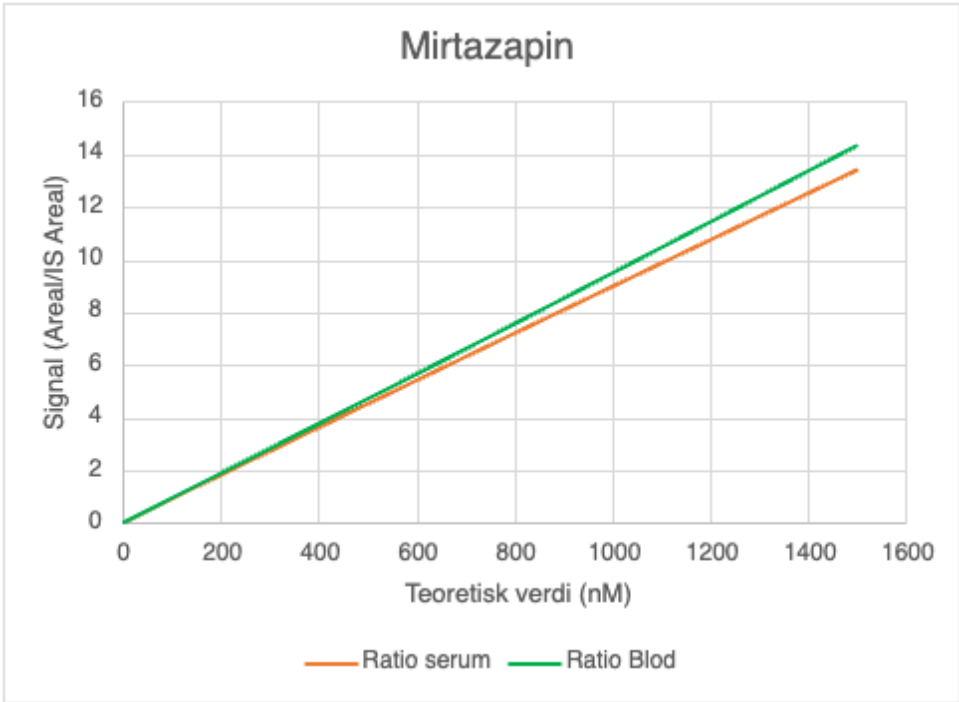
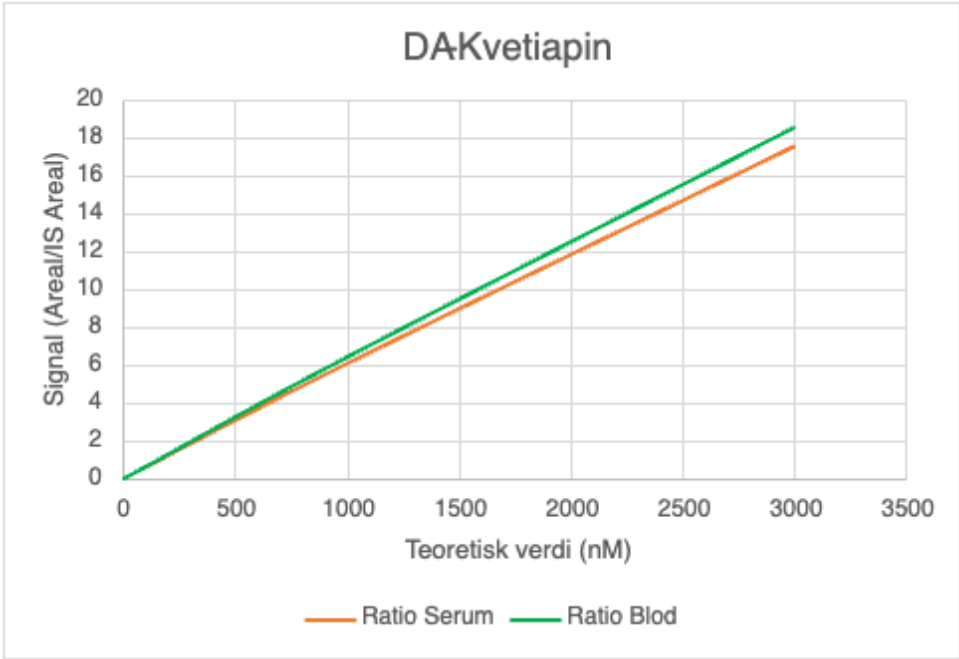
DA-Kvetiapin								
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	10	10.6	6.5%	10.5	4.5%	10.1	1.2%	4.1
Std2	100	104.6	4.6%	104.4	4.4%	103.5	3.5%	4.1
Std3	1000	1,048.2	4.8%	1033.0	3.3%	1057.2	5.7%	4.6
Std4	3000	3,038.2	1.3%	3106.7	3.6%	3181.6	6.1%	3.6
QC1	15	16.3	8.8%	17.2	14.6%	16.1	7.6%	10.3
QC2	500	525.8	5.2%	534.8	7.0%	524.0	4.8%	5.6
QC3	2400	2,575.5	7.3%	2508.3	4.5%	2532.3	5.5%	5.8

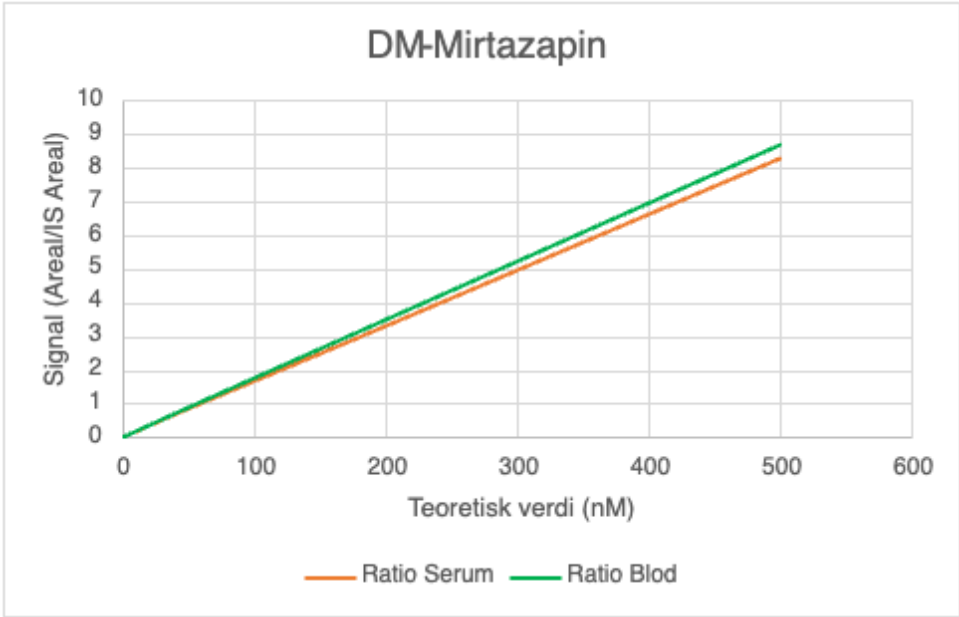
Mirtazapin								
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	10	9.8	-1.6%	10.0	0.0%	11.2	12.0%	3.5
Std2	100	105.6	5.6%	103.0	3.0%	103.4	3.4%	4.0

Std3	750	773.1	3.1%	757.0	0.9%	785.0	4.7%	2.9
Std4	1500	1,519.1	1.3%	1558.6	3.9%	1607.3	7.2%	4.1
QC1	15	15.5	3.5%	16.4	9.3%	15.7	4.5%	5.7
QC2	250	258.5	3.4%	245.4	-1.8%	248.3	-0.7%	0.3
QC3	1200	1,186.0	-1.2%	1233.9	2.8%	1219.5	1.6%	1.1
DM- Mirtazapin								
	Teoretisk verdi (nM)	Konsentrasjon dag 1 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 2 (nM)	% avvik	Konsentrasjon dag 3 (nM)	% avvik	Gjennomsnittlig avvik (%)
Std1	5	5.1	1.1%	5.6	12.9%	5.2	3.9%	5.9
Std2	50	52.4	4.9%	52.1	4.3%	53.0	6.0%	5.1
Std3	200	211.2	5.6%	208.1	4.1%	210.0	5.0%	4.9
Std4	500	529.9	6.0%	518.6	3.7%	525.0	5.0%	4.9
QC1	7.5	8.1	8.3%	8.5	13.2%	8.1	7.8%	9.8
QC2	75	80.1	6.9%	76.9	2.5%	78.8	5.1%	4.8
QC3	400	426.9	6.7%	413.3	3.3%	420.8	5.2%	5.1

Vedlegg 6: Kalibreringskurver

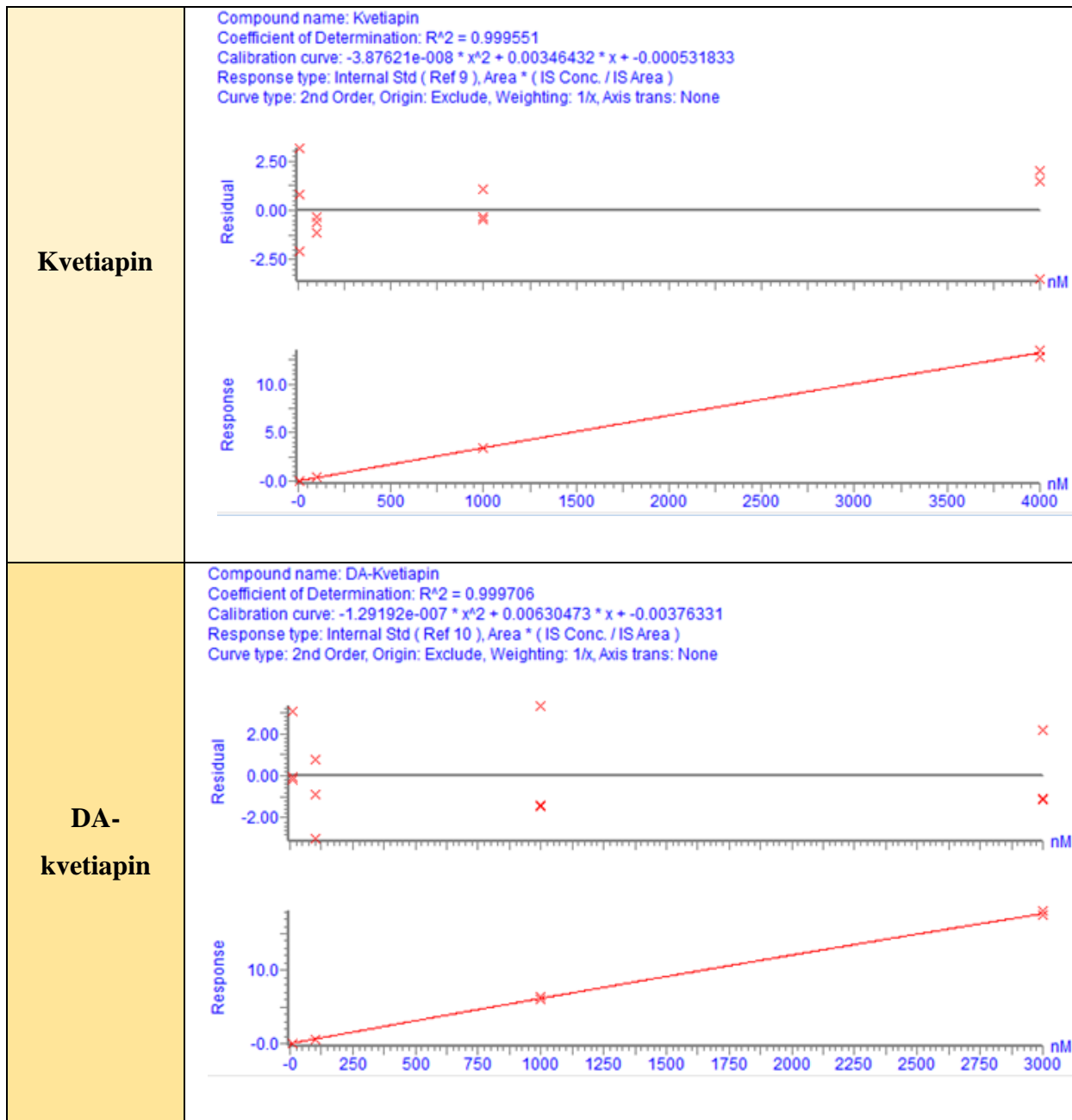


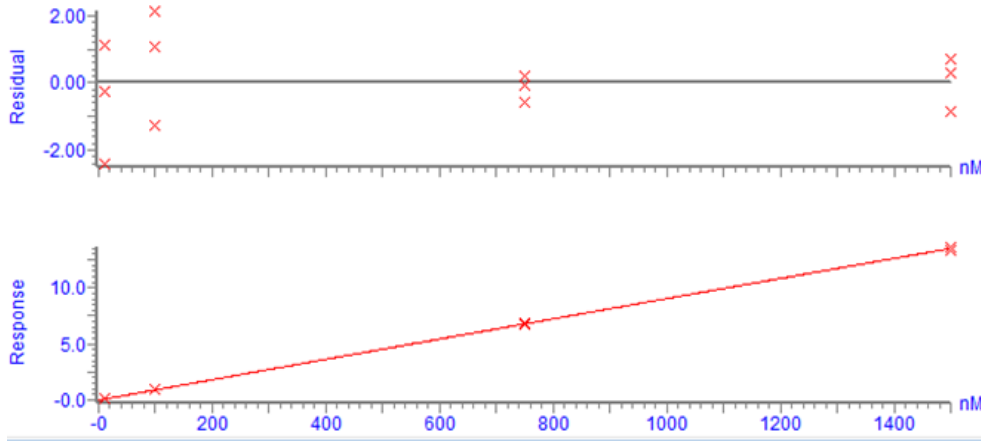
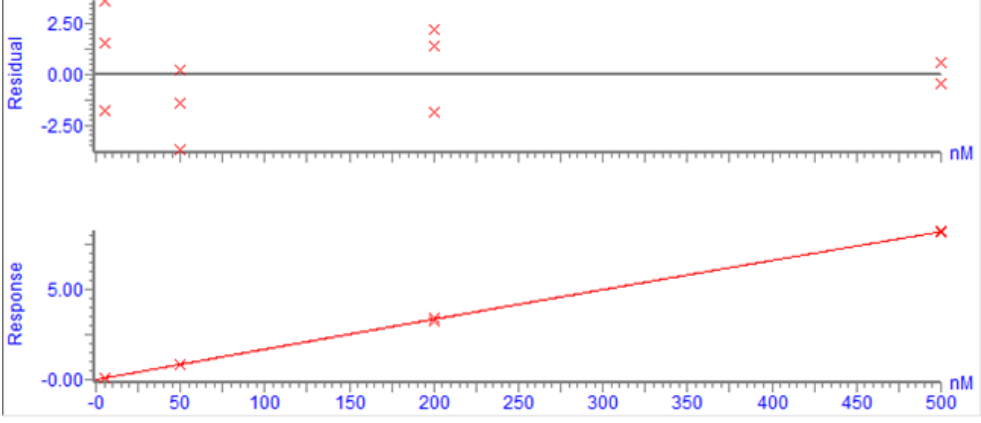




Vedlegg 7: Standardkurvene og residualene (%)

Standardkurve og residualplott	
Kvadratisk kurvetilpasning	
Klozapin	<p>Compound name: Klozapin Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999545$ Calibration curve: $-3.23416e-008 * x^2 + 0.00295124 * x + -0.00203956$ Response type: Internal Std (Ref 7), Area * (IS Conc. / IS Area) Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None</p>
DM-klozapin	<p>Compound name: DM-Klozapin Coefficient of Determination: $R^2 = 0.999950$ Calibration curve: $-1.49632e-007 * x^2 + 0.00461105 * x + -0.00991336$ Response type: Internal Std (Ref Multiple), Area * (IS Conc. / IS Area) Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None</p>



<p>Mirtazapin</p>	<p>Compound name: Mirtazapin Coefficient of Determination: R² = 0.999955 Calibration curve: $-5.80087e-008 * x^2 + 0.00909697 * x + -0.000816392$ Response type: Internal Std (Ref 11), Area * (IS Conc. / IS Area) Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None</p> 
<p>DM- mirtazapin</p>	<p>Compound name: DM-Mirtazapin Coefficient of Determination: R² = 0.999838 Calibration curve: $-1.18731e-006 * x^2 + 0.0170632 * x + -0.00302396$ Response type: Internal Std (Ref 12), Area * (IS Conc. / IS Area) Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None</p> 

Vedlegg 8: Konsentrasjoner for serum-standardkurve (linearitet)

Klozapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	50	49.74	49.50	50.11	49.78	-0.4	0.3068	0.62
Std2	250	251.61	250.22	259.48	253.77	1.5	4.9922	1.97
Std3	1500	1498.16	1546.37	1506.54	1517.02	1.1	25.7552	1.70
Std4	5000	5000.50	5140.52	4856.74	4999.25	0.0	141.8981	2.84
DM-Klozapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	25	25.01	24.49	25.26	24.92	-0.3	0.3957	1.59
Std2	100	99.94	97.02	96.52	97.82	-2.2	1.8493	1.89
Std3	1000	1000.08	981.29	981.11	987.49	-1.3	10.9005	1.10
Std4	2500	2499.97	2484.38	2470.55	2484.97	-0.6	14.7154	0.59
Kvetiapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	10	10.01	10.29	10.53	10.28	2.8	0.2626	2.56
Std2	100	99.91	100.46	100.71	100.36	0.4	0.4102	0.41
Std3	1000	1000.11	998.42	1013.67	1004.07	0.4	8.3624	0.83
Std4	4000	3999.97	3980.56	3792.31	3924.28	-1.9	114.6987	2.92
DA-Kvetiapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	10	9.98	9.65	9.66	9.77	-2.3	0.1869	1.91
Std2	100	100.21	101.91	98.08	100.07	0.1	1.9205	1.92
Std3	1000	999.71	999.54	1047.67	1015.64	1.6	27.7407	2.73
Std4	3000	3000.10	3098.63	2998.78	3032.50	1.1	57.2749	1.89
Mirtazapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	10	9.76	9.71	10.39	9.95	-0.5	0.3791	3.81

Std2	100	102.88	99.53	104.95	102.45	2.5	2.7313	2.67
Std3	750	745.11	740.63	764.15	749.96	0.0	12.4889	1.67
Std4	1500	1502.25	1542.43	1494.01	1512.90	0.9	25.9071	1.71
DM-Mirtazapin		Konsentrasjon (nM)						
	Teoretisk verdi (nM)	Parallell 1	Parallell 2	Parallell 3	Gjennomsnitt	Bias (%)	SD	CV (%)
Std1	5	4.93	5.10	5.21	5.08	1.6	0.1392	2.74
Std2	50	51.02	49.02	50.21	50.08	0.2	1.0028	2.00
Std3	200	198.59	206.74	205.08	203.47	1.7	4.3077	2.12
Std4	500	500.47	495.53	495.46	497.15	-0.6	2.8723	0.58

Vedlegg 9: Korrelasjonskoeffisienter

	Måleområde (nM)	Korrelasjonskoeffisienter
Klozapin	50-5000	0.9996
DM-Klozapin	25-2500	0.9997
Kvetiapin	10-4000	0.9997
DA-Kvetiapin	10-3000	0.9997
Mirtazapin	10-1500	1.0000
DM-Mirtazapin	5-500	0.9999