

Mastergradsoppgave i kjemi

**Marianne Skov-Skov  
Bergh**

**Utvikling av  
væskekromatografi-  
massespektrometri-  
metoder for bestemmelse  
av neurotransmittere i  
dialysat og hjernevev fra  
rotte og mus**

**60 studiepoeng**

**KJEMISK INSTITUTT**

Det matematisk-naturvitenskapelige  
fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO 06/2014**



## FORORD

Denne oppgaven ble utført ved Folkehelseinstituttet, divisjon for rettsmedisinske fag, avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling fra august 2012 til juni 2014 i samarbeid med Universitetet i Oslo, Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet, Kjemisk institutt. Mine veiledere har vært professor Elsa Lundanes, forsker Åse Marit Øiestad og forsker Inger Lise Bogen.

Jeg vil aller først takke de fantastiske veilederne mine; Åse Marit Leere Øiestad, Inger Lise Bogen og Elsa Lundanes. Dere har fulgt meg godt opp og gitt meg konstruktive råd og vink på veien. En spesielt stor takk til Åse Marit som alltid kunne svare på underfundige spørsmål, gi løsninger på intrikate problemstillinger og komme med motiverende ord når det følte ut som enden var nær. Jeg vil gi en stor takk til Inger Lise for hennes positive holdning, hjelp med nevrobiologiske problemstillinger og for at hun utførte arbeid med forsøksdyr og bisto med labarbeid.

Jeg vil også takke forsker André Gottås for å ha utført mikrodialyse og hjulpet meg med bearbeiding av data fra forsøkene. Spesielt vil jeg takke avdelingsingeniør Elisabeth Nerem for hjelp på laben og for motiverende kaffepauser. Avdelingsingeniør Synne Steinsland og doktorgradsstipendiat Anne Marte Sjursen Kvello fortjener også en takk for deres bidrag med dyreforsøk og labarbeid.

Jeg vil takke alle mine venner som har motivert meg og lokket meg med ut i sollyset når hjernen trengte hvile. Spesielt vil jeg takke Roar von Schreuder for all støtte og kaffepausene der han tålmodig hørte meg fortelle om oppgaven han ikke forsto et kvekk av.

Til slutt vil jeg takke familien min for alltid å ha støttet meg og holdt ut alle telefonsamtaler om analyse, musehjerner og væskechromatografi.

Oslo, Norge, 26. juni 2014

Marianne Skov-Skov Bergh

## SAMMENDRAG

Inntak av rusmidler endrer signaliseringssystemet av neurotransmittere i hjernen. For å kunne vurdere effekten av forskjellige rusmidler er det derfor viktig å kunne bestemme nivåene av neurotransmittere. Dette kan studeres ved rusmiddeleksponering av forsøksdyr, med påfølgende analyse av hjernevev eller hjernens ekstracellulære væske (ECV) ved anvendelse av avanserte analytiske teknikker.

Ved avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling ved divisjon for rettsmedisinske fag på Folkehelseinstituttet (FHI) drives forskning på neurobiologiske mekanismer for akutt og gjentatt rusmiddeleksponering. I denne forbindelse benyttes dyremodeller med rusmiddeleksponering av rotter og mus. Mange rusmidler virker inn på det serotonerge systemet i hjernen og målet med denne oppgaven var primært å utvikle og validere en ultraytelse væskekromatografi tandem massespektrometri (UPLC<sup>®</sup>-MS/MS) metode for bestemmelse av neurotransmitteren serotonin (5-HT) og 5-HT-metabolitten 5-hydroksyindoledisyre (5-HIAA) i mikrodialysat fra rotte, men det var også ønsket å inkludere noradrenalin (NE), acetylkolin (ACh), glutaminsyre (Glu) og  $\gamma$ -aminosmørsyre (GABA). Underveis i metodeutviklingen ble dopamin (DA) og DA-metabolittene 3-metoksytyramin (3-MT), 3,4-dihydroksyfenyleddisyre (DOPAC) og homovanilinsyre (HVA) inkludert i analysemetoden for å kunne få et mest mulig helhetlig bilde av endringer i neurotransmitternivåer ved rusmiddeleksponering. Det ble også utviklet en metode for bestemmelse av neurotransmitterne og neurotransmittermetabolittene i hjernevev.

En UPLC-MS/MS metode for bestemmelse av 5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT, NA, ACh, Glu og GABA i mikrodialysat ble utviklet og validert. De negative ionene DOPAC og HVA måtte fjernes fra metoden fordi instrumentet som ble brukt til validering ga svært lavt/ikke signal i negativ modus. Ulike separasjonsprinsipper og kolonner ble undersøkt før det ble funnet at gradient-eluering på en Waters Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub>-kolonne med en mobilfase bestående av 25 mM maursyre (FA) og metanol (MeOH) ga best separasjon og var best tilpasset laboratoriets rutinedrift. Validering av metoden viste god linearitet ( $R^2 > 0,99$ ) over et stort konsentrasjonsområde for alle forbindelser med unntak av NE. Minste detekterbare konsentrasjon (MDK) var 0,5-3,8 nM (5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT og ACh) og 14-55 nM (GABA, Glu og NE). Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) var 0,77-2,0 nM (5-HT, DA, 3-MT, ACh) og 12-

$3,6 \cdot 10^2$  nM (5-HIAA, GABA, Glu og NE). Repeterbarhet, intermediær presisjon og nøyaktighet var tilfredsstillende for alle analytter, med unntak av GABA, med relativ standardavvik (RSD) og bias på hhv.  $< 20\%$  og  $80-120\%$  ved MKK og høyere konsentrasjoner. GABA viste avvikende repeterbarhet (RSD =  $21\%$ ) ved MKK. Det ble funnet at forbindelsene med lavest retensjonsfaktor; Glu, NE og ACh ble påvirket av matrikseffekter fra salter i prøvene. Intern standard (IS) for 3-MT var ikke optimal fordi matrikseffekter ble større etter korrigerings. Det er ønskelig å anskaffe isotopmerkede IS for alle forbindelser for å korrigere for matrikseffektene. Det ble funnet at forbindelsene er mest stabile i askorbinsyre, og bør tilsettes dette. Neurotransmitterne og neurotransmittermetabolittene er ustabile ved romtemperatur, i kjøleskap ved  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  og i fryser ved  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Det ble imidlertid funnet at forbindelsene var mer stabile i kjøleskap enn i fryser, men stabiliteten ved lavere temperaturer bør undersøkes.

Neurotransmittere i mikrodialysat fra en rotte eksponert for heroinmetabolitten 6-MAM ble bestemt med metoden. Det ble funnet at metoden kan brukes til å bestemme 5-HIAA, 5-HT, GABA og Glu i mikrodialysat fra det ventral tegmentale område (VTA) og nucleus accumbens (NAc) i rottehjerne. DA og 3-MT kunne detekteres i VTA og NAc, men oppkonsentrering kreves for kvantifisering. NE kunne detekteres, men grunnet den avvikende lineariteten og påvirkning fra matrikseffekter kunne ikke forbindelsen kvantifiseres nøyaktig. ACh finnes i for lave konsentrasjoner i VTA og NAc til å kunne kvantifiseres med metoden. Ved analyse av reelle prøver ble det vist en interessant økning av 5-HT og 5-HIAA etter eksponering for 6-MAM. En økning av 5-HT og 5-HIAA etter heroineksponering er kun blitt rapportert tidligere i, oss bekjent, én publikasjon. Endringen i 5-HT og 5-HIAA som følge av eksponering for heroinmetabolitten 6-MAM har ikke blitt vist tidligere og det er av interesse å undersøke dette inngående ved mikrodialyse av flere rotter.

En UPLC-MS/MS-metode for bestemmelse av 5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT, DOPAC, HVA, NE, ACh, Glu og GABA i hjernevev ble utviklet og delvis validert. Separasjon av analyttene ble utført med gradienteluering på en Waters Acquity UPLC<sup>®</sup> HSS T3 C<sub>18</sub> kolonne med en mobilfase bestående av 25 mM FA og MeOH. HVA og DOPAC oppfylte ikke fastsatte valideringskrav og revalidering skal utføres for disse. Validering av metoden viste god linearitet ( $R^2 > 0,99$ ) over et stort konsentrasjonsområde for alle forbindelser. MDK var  $0,75-7,1$  nM (5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT, NE, ACh, Glu og GABA) og hhv. 100 nM (DOPAC) og 400 nM (HVA), mens MKK var



6,0-49 nM (5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT, NE, ACh, Glu og GABA). Repeterbarhet, intermediær presisjon og nøyaktighet var tilfredsstillende med RSD < 20 % og bias på 80-120 % ved MKK og høyere konsentrasjoner for alle forbindelser. Valideringen ble utført på to ulike instrumenter med forskjellig følsomhet og dette kan ha bidratt til økt variasjon. Det ble også funnet at det hadde vært en lekkasje i det ene instrumentet under valideringen, noe som kan ha ført til økt variasjon. Valideringen bør derfor utføres på nytt på instrumenter med lignende følsomhet for å undersøke om MDK og MKK kan bedres.

Ulike prøveopparbeidingsmetoder for analyse av hjernehomogenat ble undersøkt. Proteinfelling med 85/15 acetonitril (ACN)/MeOH, 5 % perklorsyre (PCA) og 0,25 M FA ble utprøvd og det ble funnet at proteinfelling med 0,25 M FA ga høyest gjenfinning av analytt.

Hjernevevsprøver fra dorsale striatum (DS), prefrontale cortex (PFC) og NAc fra mus eksponert for heroin og NaCl (kontrollgruppe) ble analysert med UPLC-MS/MS-metoden. Det ble funnet at metoden kan brukes til å kvantifisere alle neurotransmitterne og metabolittene i hjernevev med unntak av HVA og DOPAC. For nøyaktig kvantifisering av prøver fra NAc kreves imidlertid ny validering siden NAc ble mer oppkonsentrert enn prøvene brukt ved validering. GABA og Glu finnes i for høye konsentrasjoner i homogenatprøvene til å kunne kvantifiseres direkte og prøver må fortynnes. Optimal fortynningsfaktor for kvantifisering av GABA og Glu bør finnes og en validering for bestemmelse av GABA og Glu utføres. Interessante tendenser til påvirkning av 3-MT nivå og neurotransmitter/metabolittforholdstall etter rusmiddeleksponering ble vist og vil bli undersøkt inngående i videre studier ved FHI.

## FORKORTELSER

	Engelsk	Norsk
<b>5-HT</b>	5-Hydroxytryptamine (serotonin)	5-Hydroksytryptamin (serotonin)
<b>5-HIAA</b>	5-Hydroxyindoleacetic acid	5-Hydroksyindoleddiksyre
<b>6-MAM</b>	6-Monoacetylmorphine	6-Monoacetylmorfin
<b>3-MT</b>	3-Methoxytyramine	3-Metoksytyramin
<b>ACh</b>	Acetylcholine	Acetylkolin
<b>ACN</b>	Acetonitrile	Acetonitril
<b>ANS</b>	Autonomic nervous system	Autonome nervesystem
<b>CNS</b>	Central nervous system	Sentralnervesystemet
<b>COMT</b>	Catechol-O-methyltransferase	Katekol-O-metyltransferase
<b>DA</b>	Dopamine	Dopamin
<b>DHBA</b>	3,4-Dihydroxybenzylamine	3,4-Dihydroksybensylamin
<b>DOPAC</b>	3,4-Dihydroxyphenylacetic acid	3,4-Dihydroksyfenyleddiksyre
<b>DS</b>	Dorsal striatum	Dorsale striatum
<b>ECD</b>	Electrochemical detection	Elektrokjemisk deteksjon
<b>ECV</b>	Extracellular fluid	Ekstracellulær væske
<b>ESI</b>	Electrospray ionization	Elektrosprayionisering
<b>FA</b>	Formic acid	Maursyre

	<b>Engelsk</b>	<b>Norsk</b>
<b>FEP</b>	Fluorinated ethylene propylene	Fluorinert etylen propylen
<b>FHI</b>	Norwegian Institute of Public Health	Folkehelseinstituttet
<b>FLD</b>	Fluorescence detection	Fluorescensdeteksjon
<b>GABA</b>	Gamma amino butyric acid	Gamma aminosmørsyre
<b>Glu</b>	Glutamic acid	Glutaminsyre
<b>HILIC</b>	Hydrophilic interaction liquid chromatography	Hydrofil interaksjonsvæskrokromatografi
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography	Høytrykksvæskrokromatografi
<b>HVA</b>	Homovanilic acid	Homovanilinsyre
<b>i.d.</b>	Inner diameter	Indre diameter
<b>IS</b>	Internal standard	Internstandard
<b>LC</b>	Liquid chromatography	Væskrokromatografi
<b>MAO</b>	Monoamine oxidase	Monoaminooksidase
<b>MDK</b>	Lower limit of detection	Minste detekterbare konsentrasjon
<b>ME</b>	Matrix effect	Matrikseffekt
<b>MeOH</b>	Methanol	Metanol
<b>MKK</b>	Limit of quantification	Minste kvantifiserbare konsentrasjon
<b>MP</b>	Mobile phase	Mobilfase
<b>MRM</b>	Multiple reaction monitoring	Multipel reaksjonsmonitorering

	<b>Engelsk</b>	<b>Norsk</b>
<b>MS</b>	Mass spectrometry	Massespektrometri
<b>MS/MS</b>	Tandem mass spectrometry	Tandem massespektrometri
<b>NAC</b>	Nucleus Accumbens	Nucleus Accumbens
<b>NE</b>	Norepinephrine	Noradrenalin
<b>PCA</b>	Perchloric acid	Perklorsyre
<b>PFC</b>	Prefrontal cortex	Prefrontal cortex
<b>PNS</b>	Peripheral nervous system	Perifere nervesystem
<b>RP</b>	Reversed phase	Omvendt fase
<b>RP-LC</b>	Reversed phase liquid chromatography	Omvendt fase væskekromatografi
<b>RSD</b>	Relative standard deviation	Relativt standardavvik
<b>SD</b>	Standard deviaton	Standardavvik
<b>S/N</b>	Signal to noise ratio	Signal til støy forhold
<b>SP</b>	Stationary phase	Stasjonærfase
<b>TIC</b>	Total ion chromatogram	Total ione chromatogram
<b>UFLC</b>	Ultra fast liquid chromatography	Ultrarask væskekromatografi
<b>UPLC<sup>®</sup></b>	Ultra performance liquid chromatography	Ultra ytelse væskekromatografi
<b>UHPLC</b>	Ultra high pressure liquid chromatography	Ultrahøytrykks væskekromatografi

	<b>Engelsk</b>	<b>Norsk</b>
<b>VTA</b>	Ventral tegmental area	Ventral tegmental området

# Innholdsfortegnelse

1. INTRODUKSJON .....	1
1.1 Rusmidlers påvirkning av neurotransmitternivå .....	1
1.2 Neurotransmittersystemer .....	2
1.2.1 Dopamin .....	5
1.2.2 Noradrenalin .....	6
1.2.3 Serotonin (5-HT).....	6
1.2.4 Acetylkolin.....	7
1.2.5 $\gamma$ -aminosmørsyre .....	8
1.2.6 Glutaminsyre.....	9
1.3 Innsamling og opparbeiding av biologiske prøver for bestemmelse av neurotransmittere .....	10
1.3.1 Mikrodialyse.....	10
1.3.2 Proteinfelling av hjernehomogenat .....	11
1.4 Analysemetode .....	12
1.4.1 Omvendt fase kromatografi.....	12
1.4.2 HILIC .....	12
1.4.3 Nullretensjonstid.....	14
1.4.4 Ultrahøytrykks væskekromatografi .....	14
1.4.5 MS .....	15
1.5 Bestemmelse av neurotransmittere .....	20
1.6 Mål med oppgaven .....	21
2. EKSPERIMENTELT .....	23
2.1 Kjemikalier .....	23

2.2 Forsøksdyr.....	23
2.3 Løsninger .....	24
2.3.1 Stamløsninger .....	24
2.3.2 Standarder .....	24
2.3.3 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av mikrodialysat .....	24
2.3.4 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av hjernevev .....	26
2.3.5 Internstandard .....	27
2.4 Uttak av mikrodialysat etter perfundering med 6-MAM i rotte .....	28
2.5 Opparbeiding og analyse av mikrodialyseprøver .....	30
2.6 Proteinfelling av hjernehomogenat.....	30
2.6.1 Proteinfelling med ACN/MeOH (85/15, v/v) .....	30
2.6.2 Proteinfelling med 0,25 M FA .....	31
2.6.3 Proteinfelling med 5 % PCA .....	31
2.7 Uttak av hjerneprøver fra heroineksponerte mus .....	32
2.8 Prøveoppbeidelse og analyse av hjernevev fra heroineksponerte mus.....	32
2.9 UPLC-systemet.....	33
2.10 Bestemmelse av MS-overganger for analyttene .....	35
2.11 Kvantifisering og beregninger.....	36
2.12 Statistiske beregninger .....	36
2.12.1 Uteliggertest .....	36
2.12.2 Nøyaktighet og presisjon .....	36
2.12.3 T-test .....	37
3. RESULTATER OG DISKUSJON .....	38
3.1 Metodeutvikling .....	38
3.1.1 Optimalisering av MS-parametre .....	38
3.1.2 Bestemmelse og optimalisering av MS-overganger .....	39

3.1.3 Undersøkelse av en HILIC- metode.....	40
3.1.4 Utvikling av en RP-metode.....	46
3.2 Valg av fellingsmetode for hjernehomogenat.....	68
3.3 Validering av metode for analyse av mikrodialysat .....	72
3.3.1 MDK.....	72
3.3.2 MKK.....	74
3.3.3 Linearitet.....	75
3.3.4 Retensjonsstabilitet for internstandard .....	76
3.3.5 Repeterbarhet og nøyaktighet.....	76
3.3.6 Intermediær presisjon og nøyaktighet .....	78
3.3.7 Overdrag .....	80
3.3.8 Selektivitet .....	80
3.3.9 Matrikseffekter .....	82
3.3.10 Stabilitet.....	86
3.3.11 Konklusjoner fra validering og videre arbeid.....	94
3.4 Validering av metode for analyse av hjernevev .....	95
3.4.1 MDK.....	95
3.4.2 MKK.....	96
3.4.3 Linearitet.....	97
3.4.4 Repeterbarhet og nøyaktighet.....	98
3.4.5 Intermediær presisjon og nøyaktighet .....	100
3.4.6 Konklusjoner fra validering og videre arbeid.....	102
3.5 Analyse av reelle prøver .....	102
3.5.1 Analyse av mikrodialysatprøver.....	102
3.5.2 Analyse av hjernevevsprøver .....	106
4. KONKLUSJON .....	112



5. REFERANSER .....	114
6. APPENDIKS.....	123
6.1 Undersøkelse av ulike parametere ved bruk av HILIC-kolonner .....	123
6.1.1 Effekten av temperatur i HILIC.....	123
6.1.2 Ionestyrke .....	124
6.1.3 Løsningsmiddel i HILIC .....	125
6.1.4 Regenereringstid i HILIC.....	126
6.2 Løsninger brukt til metodeutvikling og validering.....	127
6.2.1 Standarder brukt ved undersøkelse av fellingsmetoder for hjernehomogenat ...	127
6.2.2 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av mikrodialysat .....	127
6.2.3 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av hjernevev .....	129
6.3 Beregninger og statistikk ved valg av prøveopparbeidingsmetode .....	129
6.4 Beregninger og statistikk for validering av analyse av mikrodialysat .....	131
6.4.1 Repeterbarhet og nøyaktighet.....	131
6.4.2 Intermediær presisjon .....	135
6.4.3 Matrikseffekter .....	144
6.4.4 Holdbarhet .....	146
6.5 Beregninger og statistikk for validering av analyse av hjernevev .....	152
6.5.1 Repeterbarhet.....	152
6.5.2 Intermediær presisjon og nøyaktighet .....	153
6.6 Reelle prøver.....	154
6.6.1 Analyse av mikrodialysatprøver.....	154
6.6.2 Analyse av hjernevevsprøver .....	155

# 1. INTRODUKSJON

## 1.1 Rusmidlers påvirkning av neurotransmitternivå

Signaliseringssystemet av neurotransmittere i hjernen påvirkes ved inntak av rusmidler (Bear et al. 2007). Ulike rusmidler har en rekke farmakodynamiske effekter og har blitt assosiert med modulering av de fleste neurotransmitterne i det sentrale nervesystemet (Davies 2007).

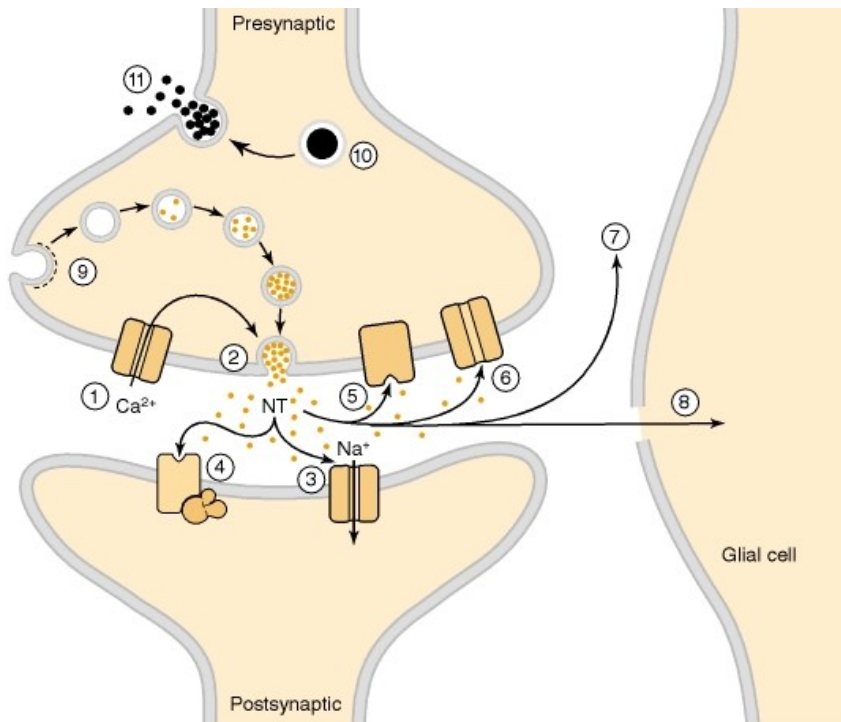
Virkningene av forbindelser som gir rus kan deles inn i tre hovedkategorier basert på om de har dempende, stimulerende eller hallusinogen effekt. Neurotransmittersystemene i hjernen som er mest omtalte i forbindelse med rusmiddeleffekter er det dopaminerge og serotonerge nervesystem. Eksempelvis er det mesokortikolimbiske system assosiert med belønningseffekter i hjernen som fremmer adferd som er viktig for overlevelse, slik som sex og inntak av mat. Systemet består av dopaminerge nevroner gruppert i det VTA, og substantia nigra i midthjernen. Aksonene til nevronene strekker seg imidlertid til det ventrale striatum (VS), NAc, prefrontale cortex (PFC), cingular cortex og amygdala (Pierce og Kumaresan 2006). Aktiveringen av det mesokortikolimbiske system gir en sterkere respons enn naturlig stimuli, som «overstyrer» hjernens belønningssystem (Hyman 2005a). Generelt gir alle rusmidler gjennom ulike virkningsmekanismer en DA-økning i NAc (Nestler 2005). Den viktigste reaksjonsmekanismen som er knyttet til sentralstimulerende midler (kokain, amfetamin) skjer gjennom det dopaminerge systemet (Davies 2007), men amfetamin påvirker også 5-HT og noradrenalin nivåene (Steketee 2003). Dempende rusmidler som heroin inhiberer GABA slik at GABA konsentrasjonen minker (Kauer og Malenka 2007). GABA modulerer normalt DA-konsentrasjonen ved inhibering av DA-nevroner. Når GABA inhiberes de-inhiberes DA-nevronene og konsentrasjonen av DA i VTA øker (Nestler 2005). Etter inntak metaboliseres heroin raskt til den aktive metabolitten 6-MAM, og videre til morfin (Boix et al. 2013). Det har blitt funnet at injeksjon med kun 6-MAM, også øker mengden dopamin i hjernen (Gottås et al. 2014). Hallusinogener som f.eks LSD (lysergisyredietylamid) har en dominerende effekt på 5-HT-systemet (Bear et al. 2007, Davies 2007). Enkelte sentralstimulerende stoffer (MDMA (3,4-metylendioksyamfetamin), MDA (3,4-metylendioksyamfetamin)) er også vist at gir en effekt på serotonin signaliseringen (Zhang og Beyer 2006).

## 1.2 Nevrotransmittersystemer

Nevroner utveksler informasjon med hverandre hovedsaklig ved kjemisk synaptisk transmisjon. Transmisjonen skjer ved kontaktområder mellom nevroner kalt synapser (Siegel et al. 1999). Når et aksjonspotensiale ankommer den presynaptiske nerveterminalen åpnes spenningsavhengige  $\text{Ca}^{2+}$ -kanaler. Økningen av kalsiumioner i den presynaptiske terminalen fører til at synaptiske vesikler fylt med nevrotransmittere smelter sammen med den presynaptiske membranen og nevrotransmittere frigjøres i synapsespalten. Transmittermolekylene vandrer deretter over den synaptiske kløften og binder seg til spesifikke reseptorer på den postsynaptiske membranen. Reseptorene er enten koblet direkte til ionekanaler eller virker via "second messenger" systemer. Ved direkte kobling åpnes ionekanaler i membranen på cellen. De åpne kanalene tilfører enten hyperpolariserende negative ladninger (inhibitorisk) i form av  $\text{Cl}^-$  eller depolariserende positive ladninger (eksitatorisk) i form av  $\text{Na}^+$  til den postsynaptiske cellen (Hardie 1991, Hyman 2005b, von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006). For å avslutte den synaptiske aktiviteten må nevrotransmitterne inaktiveres. Dette skjer ved gjenopptak i den presynaptiske cellen via spesifikke transportproteiner, enzymatisk nedbrytning, eller opptak og nedbrytning i nærliggende gliaceller (Masson et al. 1999, Siegel et al. 1999, Campbell et al. 2006). Noen av prosessene involvert ved synaptisk transmisjon er gitt i figur 1.

De fleste nevrotransmittere passer inn i de følgende tre kjemiske kategoriene: (1) aminosyrer, (2) aminer og (3) peptider (tabell 1) (Bear et al. 2007).

I denne oppgaven har nevrotransmittere i kategoriene aminosyrer og aminer, samt metabolitter av enkelte av nevrotransmitterne blitt undersøkt. Nevrotransmitterne og metabolittene som ble undersøkt var 5-HT, DA, NE, ACh, Glu og GABA, samt serotoninmetabolitten 5-HIAA, og dopaminmetabolittene HVA, DOPAC og 3-MT. Nevrotransmitterne og metabolittenes fysiske og kjemiske egenskaper er beskrevet i tabell 2.

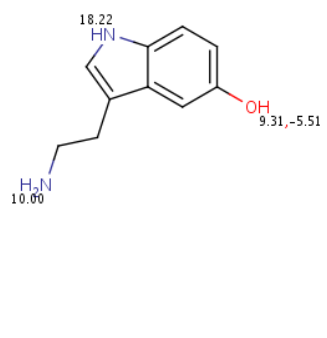
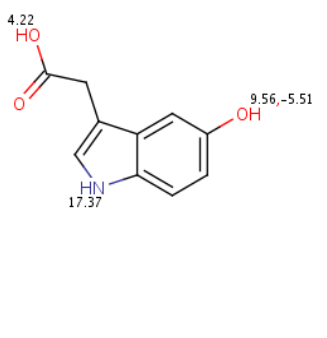
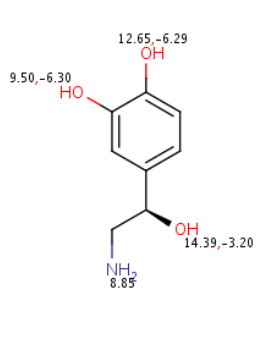
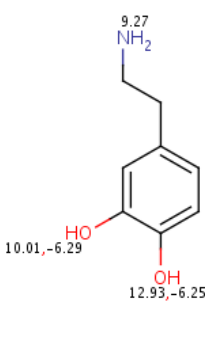
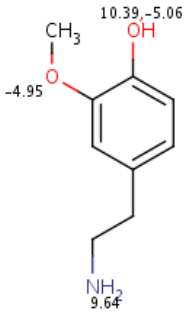
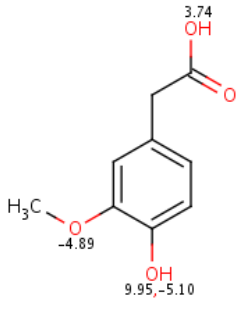
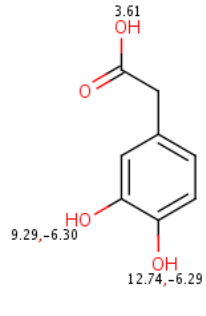
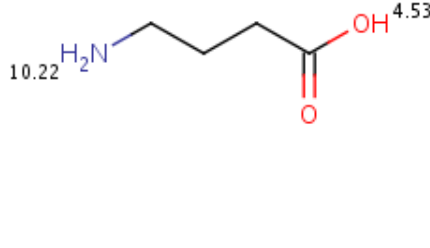
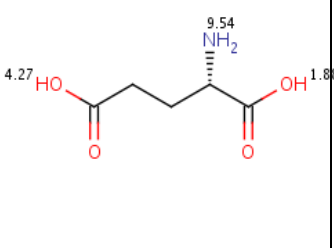
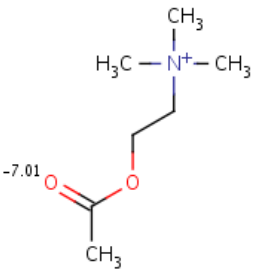


Figur 1:Kjemisk synaptisk transmisjon. (1): Spenningssensitive  $Ca^{2+}$  kanaler åpnes i den presynaptiske nerveterminalen ved depolarisering. Økningen av  $Ca^{2+}$  starter (2): sammensmeltning av neurotransmittervesikler med membranen. Neurotransmitter frigitt i synapsen (3): bindes til reseptorer på den postsynaptiske membranen koblet direkte til ionekanaler, eller (4): reseptorer koblet til second messenger systemer. (5):På den presynaptiske terminalen er det også neurotransmitterreseptorer, som enten hemmer eller øker sammensmeltningen ved følgende depolarisering. Inaktivering av frigitt neurotransmitter (6): ved gjenopptak i den presynaptiske membranen ved hjelp av et transportprotein, ved (7): degradering eller ved (8): opptak og degradering i gliaceller. Membranene til de synaptiske vesiklene resirkuleres (9). Proteiner og neuropeptider lagres i (10): store, kompaktkjernegrannuler i nerveterminalen og frigis fra (11): seter ulike de aktive sonene i synapsespalten etter repetitiv stimulering (Siegel et al. 1999). Figur hentet fra (Siegel et al. 1999)

Tabell 1: Oversikt over kjente neurotransmittere fordelt i tre kjemiske kategorier (Bear et al. 2007).

Aminosyrer	Aminer	Peptider
GABA	ACh	Kolecystokinin
Glu	DA	Dynorfin
Glysin (Gly)	NE	Enkefaliner
	Adrenalin	N-acetylaspartamglutamat
	5-HT	Nevropeptid Y
	Histamin	Somatostatin
		Substans P
		Tyrotropinfrigjørende hormon
		Vasoaktivt intestinalt polypeptid

**Tabell 2: Fysiske og kjemiske egenskaper for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene inkludert i UPLC-MS/MS med tilhørende pKa-verdier angitt i figur.**

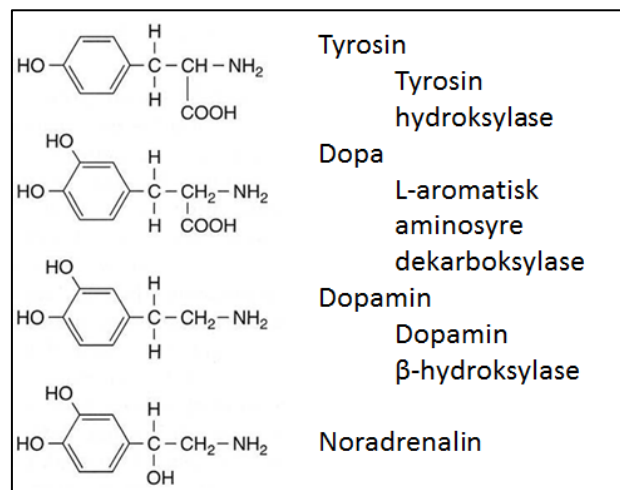
			
Navn: Serotonin (5-HT)	Navn: 5-hydroksyindoleddisyre (5-HIAA)	Navn: Noradrenalin (NE)	Navn: Dopamin (DA)
CAS nr: 50-67-9	CAS nr: 4-16-0	CAS nr: 51-41-2	CAS nr: 51-61-6
Molar masse (g/mol): 176,22	Molar masse (g/mol): 191,18	Molar masse(g/mol): 169,18	Molar masse (g/mol): 153,18
Molekylformel: C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	Molekylformel: C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	Molekylformel: C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Molekylformel: C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>
LogP: 0,2	Log P: 1,41	Log P: -0,68	Log P: 0,03
			
Navn: 3-metoksytyramin (3-MT)	Navn: Homovanilinsyre (HVA)	Navn: Dihydroksyfenyleddisyre (DOPAC)	
CAS nr: 554-52-9	CAS nr: 306-08-1	CAS nr: 102-32-9	
Molar masse (g/mol): 167,20	Molar masse (g/mol): 182,17	Molar masse (g/mol): 168,15	
Molekylformel: C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	Molekylformel: C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	Molekylformel: C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	
Log P: 0,68	Log P: 1,15	LogP: 1,0	
			
Navn: Γ- aminosmørnsyre (GABA)	Navn: Glutaminsyre*(Glu)	Navn: Acetylcholin (ACh)	
CAS nr: 56-12-2	CAS nr: 617-65-2	CAS nr: 51-84-3	
Molar masse (g/mol): 103,12	Molar masse(g/mol): 147,13	Molar masse (g/mol): 146,21	
Molekylformel: C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Molekylformel: C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	Molekylformel: C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	
Log P: -2,89	LogP: -3,24	Log P: -4,22	

\*Ofte kalt glutamat

### 1.2.1 Dopamin

DA er en amin neurotransmitter som tilhører gruppen katekolaminer (tabell 1). Katekolaminer er forbindelser som innehar en katekolkjerne (en benzenring med to hydroksylgrupper) og en aminogruppe. DA virker som neurotransmitter i både det perifere nervesystemet (PNS) og sentral-nervesystemet (CNS) og har i mange år vært i fokus grunnet dets rolle i flere neurologiske og psykiatriske sykdommer (Murrin 2007, Grace et al. 2009). Molekylstrukturen og de fysiske og kjemiske egenskapene til DA er gitt i tabell 2.

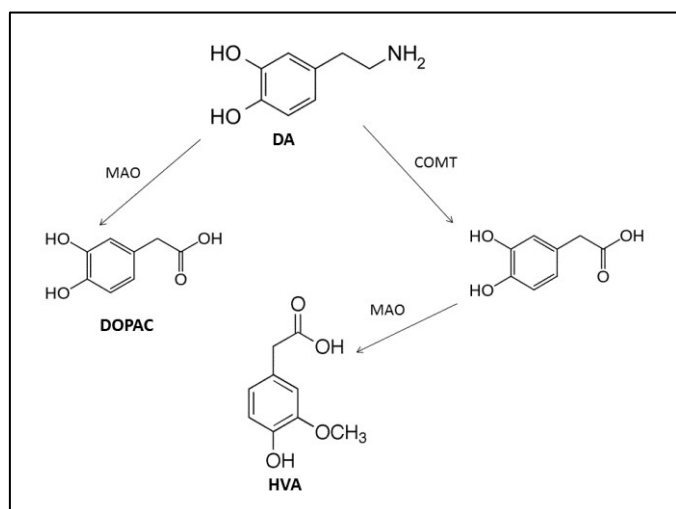
Alle katekolamine neurotransmittere blir syntetisert fra aminosyren tyrosin og gjennomgår flere enzymatiske trinn før ferdig sluttprodukt (figur 2) (Cooper et al. 2003, von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006, Bear et al. 2007). DA degraderes til dihydroksyfenyleddisyre (DOPAC) av enzymet monoamin oksidase (MAO). Neurotransmitteren metaboliseres også til 3-MT via et enzym kalt katekol-O-metyltransferase (COMT) og videre fra 3-MT til HVA av MAO. Det har blitt beskrevet at degradering til 3-MT og HVA forekommer utenfor nerve-terminalen



Figur 2: Syntese av DA og NE fra aminosyren tyrosin

(Cooper et al. 2003). Metabolismen av DA er vist i figur 3, og ytterligere informasjon om metabolittene er gitt i tabell 2.

Stimulering av dopaminreseptorer i hjernen regulerer prosesser knyttet til motorikk og bevegelse, læring, motivasjon og hukommelse (Bear et al. 2007, Sibley og Neve 2007, Foley 2009). Som nevnt i kapittel 1.1 assosieres dopamin med belønningssystemet i hjernen. Naturlige stimuli som mat, drikke og sex aktiverer systemet, og fører til økt dopamin-frigjøring i NAc (Pierce og Kumaresan 2006).



Figur 3: Metabolisme av DA

Systemet påvirkes av mange ulike rusmidler. Dempende stoffer som opiatet heroin øker frigjøringen av dopamin i NAc (Kauer og Malenka 2007). Dette gir en akutt heroinrus med en intens lykkefølelse (eufori), etterfulgt av beroligende effekter som er mer langtidsvirkende. I tillegg kan den kraftige DA-frigjøringen i NAc føre til rus-avhengighet (Nestler 2005). Inntak av sentralstimulerende stoffer som kokain, ecstasy og amfetamin øker utskillelsen av dopamin, og vil i større doser blokkere gjenopptak av neurotransmitteren. Dette gir eufori, anoreksi, hyperaktivitet og økt seksuell drift (Simonsen og Aarbakke 1997, Rindom 2001).

### **1.2.2 Noradrenalin**

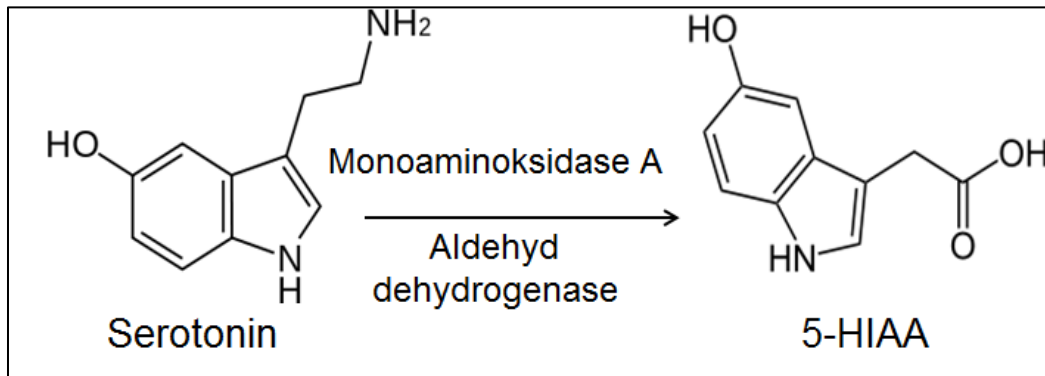
NE tilhører i likhet med DA gruppen katekolaminer (tabell 1), og dannes via samme reaksjonsvei, som beskrevet i figur 2 i kapittel 1.2.1 (Bear et al. 2007). De fleste noradrenerge cellekjerne finnes i en liten tett klase med celler, kalt locus coeruleus men aksonene strekker seg ut til store deler av CNS (Bear et al. 2007). Degraderingen av noradrenalin foregår enten ved enzymet COMT eller ved MAO (von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006, Bear et al. 2007). Molekylstrukturen og de fysiske og kjemiske egenskapene til NE er gitt i tabell 2.

Mange har beskrevet at NE i CNS er involvert i affektiv psykose, læring og hukommelse, stress, årvåkenhet og søvnsyklus (Cooper et al. 2003, Aston-Jones et al. 2009). Neurotransmitteren er også medvirkende ved regulering av aggressiv oppførsel (Siegel et al. 2009). Sammen med adrenalin øker NE hjertefrekvensen og er involvert i flukt- eller kampresponser hos dyr (Romero 2010). De sentralstimulerende rusmidlene kokain, ecstasy, amfetamin, khat og metamfetamin øker utskillelsen av NE i CNS. NE gir dilatasjon av pupiller, sammentrekning av blodkar, øker hjertefrekvens og respirasjon. Kokain gir en følelse av økt selvtillit, nedsatt smertefølelse, høyere blodtrykk og forsterket sanseintrykk (Simonsen og Aarbakke 1997, Rindom 2001).

### **1.2.3 Serotonin (5-HT)**

5-HT er en amin neurotransmitter (tabell 1), syntetisert fra aminosyren tryptofan. Antallet serotonerge nevroner i hjernen er relativt lavt, men aksonene til nevronene strekker seg imidlertid rundt til nesten hele CNS (Bear et al. 2007). Molekylstrukturen og de fysiske og kjemiske egenskapene til 5-HT er gitt i tabell 2.

Syntesen av 5-HT skjer i to trinn. Først omdannes tryptofan av enzymet tryptofanhydroksylase til intermedietet 5-HTP (5-hydroksytryptofan). Deretter omdannes 5-HTP videre til 5-HT av enzymet 5-HTP dekarboksylase (Siegel et al. 1999, Bear et al. 2007). Nedbrytningen av 5-HT til metabolitten 5-HIAA av utføres av enzymene MAO A og aldehyd dehydrogenase (figur 4) (von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006, Bear et al. 2007). De kjemiske egenskapene til 5-HIAA er gitt i tabell 2.



Figur 4: Metabolisme av 5-HT.

5-HT modulerer mange biologiske funksjoner i CNS. Det er kjent at 5-HT påvirker prosesser knyttet til læring og hukommelse, seksuell oppførsel og appetitt (von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006). 5-HT har i tillegg en effekt på humør og kognisjon (Merens et al. 2007). Lave nivåer av 5-HT kan føre til depresjon, og enkelte antidepressiva inneholder derfor stoffer som bidrar til å øke 5-HT-nivået. Ved inntak av rusmidlet ecstasy økes mengden 5-HT i hjernen, noe som medfører at brukeren blir i bedre humør og blir mer våken og utadvendt (Rindom 2001).

#### 1.2.4 Acetylcholin

ACh er en klassisk amin neurotransmitter (tabell 1). ACh er transmitter ved mange perifere synapser, slik som den nevromuskulære endeplate (synapser mellom motoriske nevroner og skjelettmuskulatur), hjertemuskulatur, glatt muskulatur og ved preganglionske synapser i PNS. I CNS finnes kolinerge synapser blant annet i store cellelegemer i midthjernen (Nicholls 1994, Cooper 2001, Bear et al. 2007). Molekylstrukturen og de fysiske og kjemiske egenskapene til ACh er gitt i tabell 2.

Syntesen av ACh skjer i ett enkelt trinn, og krever acetylkoenzym A (CoA), kolin og et enzym kalt cholin acetyltransferase som bare finnes i kolinerge nevroner. Produksjonen av ACh



skjer ved at cholin acetyltransferase overfører en acetylgruppe fra CoA til kolin. Degraderingen av ACh skjer ved rask hydrolyse til acetat og kolin av enzymet acetylkolinesterase (Nicholls 1994).

I ANS er ACh involvert i fysiologiske prosesser som økning av hjerterytme, sammentrekning av muskler og utvidelse av blodkar. I CNS er neurotransmitteren knyttet til læring og hukommelse og bestemte motoriske funksjoner. Skader i kolinerge regioner i septo-hippocampus området gir en funksjonsforstyrrelse i hukommelsen (Cooper et al. 2003, von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006). Neurotransmitteren påvirker i tillegg aggressiv oppførsel (Siegel et al. 2009). Nikotin utøver sin effekt ved å binde seg til en acetylkolinreseptor. Binding til ACh-reseptoren aktiverer frigjøring av DA fra dopaminnevroner i VTA (Bear et al. 2007, Brodal 2013).

### **1.2.5 $\gamma$ -aminosmørsyre**

GABA er en aminosyre og er den viktigste inhibitoriske neurotransmitteren i CNS. GABA er unik ved at den ikke inngår i oppbygningen av proteinene, slik som de 20 andre aminosyrene, og blir bare syntetisert i nevronene som benytter den som neurotransmitter. GABA finnes i høy konsentrasjon i flere deler av hjernen (von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006, Bear et al. 2007). Molekylstrukturen og de fysiske og kjemiske egenskapene til GABA er gitt i tabell 2.

GABA blir syntetisert fra Glu av enzymet glutaminsyre dekarboksylase. Dette enzymet forekommer bare i nevroner som bruker GABA som neurotransmitter. Nedbrytning av neurotransmitteren skjer ved transaminering med  $\alpha$ -ketoglutarsyre, under kontroll av enzymet GABA-transaminase, slik at det dannes ravsyresemialdehyd og Glu. Ravsyresemialdehyd metaboliseres videre til ravsyre av ravsyresemialdehyd dehydrogenase (Siegel et al. 1999, von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006).

Fordi GABA er en av de første neurotransmitterne som kan påvises under utviklingen av CNS, er det antatt at den spiller en viktig rolle i nevronal utvikling (Watanabe et al. 2002). En av GABA-reseptorene er involvert i regulering av vaksomhet, angst, muskelspenning, epilepsiutløsende aktivitet og begynnelsen av anterograd hukommelsestap. Derfor er GABA-reseptoren et viktig mål for anti-epileptika (Costa 2004). GABA påvirker også regulering av

aggressiv oppførsel (Siegel et al. 2009). Det er kjent at etanol binder seg til en GABA-spesifikk reseptor kalt GABA<sub>A</sub>. Disse reseptorene finnes det mange av i lillehjernen, og det er også her musklernes bevegelser koordineres. Binding av etanol til GABA<sub>A</sub>-reseptorene i lillehjernen gir den reduserte evnen til finmotorikk som ofte kan observeres hos berusede personer (Rindom 2001). Det er etanolens effekt på CNS som gir rusopplevelsen. Økende konsentrasjon av etanol gir brukeren endret stemningsleie, oppførsel og følelsesliv, nedsatt konsentrasjonsevne og intellektuelle ferdigheter (Simonsen og Aarbakke 1997).

### **1.2.6 Glutaminsyre**

Glu er en aminosyre neurotransmitter (tabell 1) som står for ca. en tredjedel av all synaptisk aktivitet. Glu er den transmitteren som finnes i høyest konsentrasjon i hjernen. Glutamaterge nevroner er fordelt over store områder av CNS og har en sterkt eksitatorisk effekt (Siegel et al. 1999, Cooper 2001, Segovia et al. 2001, Bear et al. 2007). Molekylstruktur samt fysiske og kjemiske egenskaper for Glu er gitt i tabell 2.

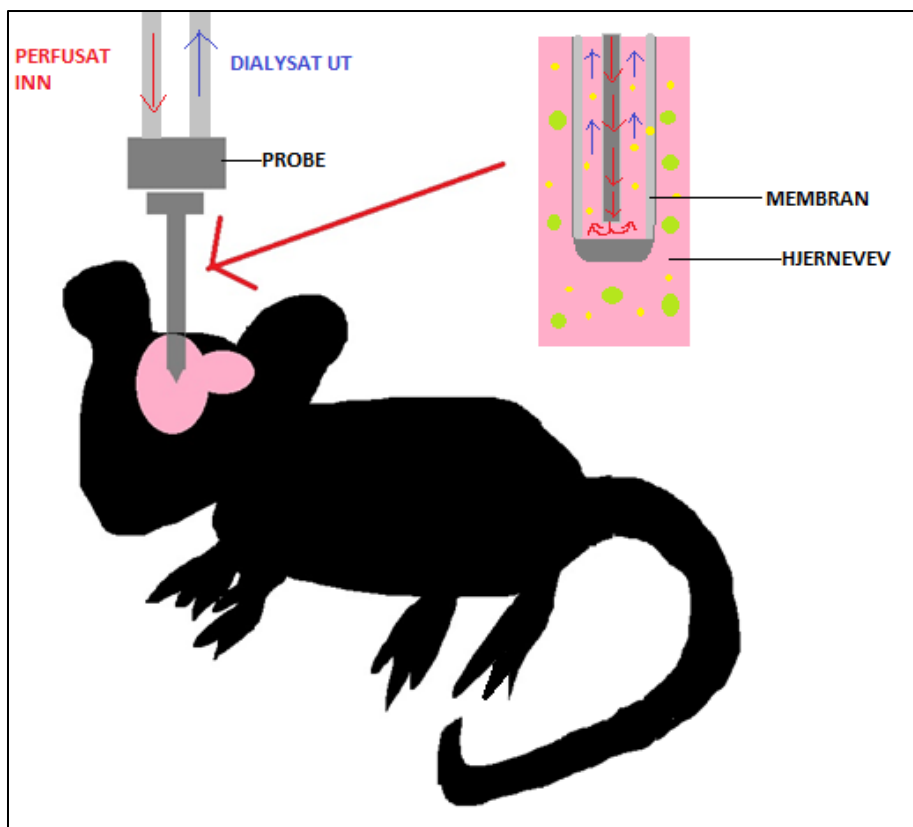
Glu syntetiseres fra to forskjellige kilder i nerveterminalene i hjernen: fra glukose via Krebszyklusen og transaminering av  $\alpha$ -ketoglutarat, og fra glutamin syntetisert i gliaceller. Frigjort Glu tas opp av nærliggende gliaceller, omdannes til glutaminsyre av glutaminase og frigjøres for gjenopptak i nerveterminalene. Glutaminet konverteres så tilbake til Glu via glutaminase (Siegel et al. 1999, Cooper 2001, Cooper et al. 2003, von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006).

Glu regulerer neuroendokrine funksjoner ved å påvirke utskillelse av hormoner i hypofysen som er knyttet til reproduksjonssyklusen. Glu deltar ved migrering av nevroner i hjerneområder under utvikling, og er involvert i mottak og prosessering av stimuli fra miljø og motorisk atferd. Det er vist at Glu også er knyttet til dannelsen av hukommelse og læring. Ved frigjøring av store mengder Glu oppstår imidlertid celledød. Dette kan gi opphav til hypoglykemi, iskemi, epileptiske anfall og sykdommer som Alzheimer, Parkinson og amyotrofisk lateralsklerose (von Bohlen und Halbach og Dermietzel 2006). Hallusinogenene PCP (fenylsyklidin) og ketamin blokkerer en Glu reseptor kalt NMDA-reseptoren. Dette kan gi bevissthets- og tankeforstyrrelser. Ketamin som bl.a. brukes ved anestesi og kan også gi bivirkninger i form av plagsomme drømmer og hallusinasjoner ved oppvåkning. Alkohol bindes også til NMDA-reseptoren (Brodal 2013).

## **1.3 Innsamling og opparbeiding av biologiske prøver for bestemmelse av neurotransmittere**

### **1.3.1 Mikrodialyse**

Mikrodialyse er en prøvetakningsmetode som brukes til å ta prøver av frie forbindelser i ECV fra mange typer vev (Chaurasia et al. 2007). Metoden kan brukes til å ta prøver av ECV i hjernen. Dette gjøres ved å implantere en probe i hjernen på et forsøksdyr (figur 5) (Perry et al. 2009). Proben består av en semipermeabel dialysemembran som er koblet til rør for innløp og utløp. I membranen skjer dialysen eller diffusjonen av molekyler mellom perfusjonsvæsken og ECV. Proben implanteres i det hjerneområdet som skal undersøkes og en fysiologisk kompatibel saltløsning (kunstig ECV), kalt Ringers løsning, infuseres sakte og kontinuerlig gjennom proben til en likevekt er oppnådd mellom innsiden av proben og det ekstracellulære rom. Membranen er permeabel for vann og små molekyler, og ECV fra det levende hjernevevet blir samlet opp i proben ved diffusjon. Perfusjonsløsningen vil etter en viss tid inneholde en representativ prøve av forbindelsene i den ekstracellulære væsken. Membranen gir en automatisk opprensing av prøven ettersom blodceller, proteiner og andre store molekyler ikke slipper igjennom, og prøven kan injiseres direkte på et væskechromatografisk system (Westerink 1995, Zhang og Beyer 2006, Chaurasia et al. 2007). De lave konsentrasjonene av neurotransmitter, samt de små volumene som tas ut ved mikrodialyse kan imidlertid gi utfordringer mht. deteksjon. I tillegg inneholder dialysatet en kompleks og konsentrert blanding av salter (Zhang og Beyer 2006). Dette krever en kromatografisk separasjon for å kunne måle de individuelle transmitterne, samt en svært følsom og spesifikk deteksjonsmetode. Grunnet dette benyttes ofte teknikker basert på LC-MS (Zhang og Beyer 2006). Metoden gir i tillegg en mulighet til å måle på mange analytter samtidig, samt utføre målinger over lengre tid uten tidkrevende prøveopparbeiding (Perry et al. 2009).



Figur 5: Skisse av en mikrodialyseprobe implantert i hjernen på en rotte. Utsnittet av proben viser hvordan perfusat (Ringers løsning) føres inn i proben hvor små molekyler passerer gjennom membranen og inn i proben til likevekt er oppnådd, før dialysat med små molekyler føres ut av proben.

### 1.3.2 Proteinfelling av hjernehomogenat

Proteinfelling er en rask og enkel metode for å fjerne proteiner før analyse av biologiske prøver. Årsaken til at proteinene må fjernes er at de ved en etterfølgende væskrokromatografisk analyse kan felle ut når de kommer i kontakt med mobilfase, og slik føre til tetting av koblinger, som gir økt mottrykk og kan nedsette funksjonen til kolonnen. Ulempene ved denne prøveopparbeidingsmetoden er at analytt kan gå tapt ved at den feller ut sammen med proteinene. Ofte brukes syrer eller organiske løsemidler til felling av proteiner. Dersom sterke syrer brukes til felling må analyttene være stabile i det lave pH-området i supernatanten. pH i supernatanten bør også være kompatibel med mobilfasen dersom supernatanten skal injiseres direkte. Ved bruk av en syre dannes et uløselig salt med den kationiske formen til proteinet ved lav pH. Syrer som ofte brukes er trikloreddiksyre og PCA. Ved felling med organiske løsemidler reduseres løseligheten til proteinene, slik at de feller ut. Løsemidlene som benyttes er blandbare med vann, slik som aceton, metanol,

etanol og acetonitril, og holdes ofte kalde slik at løseligheten til proteinene reduseres ytterligere (McDowall 1989).

## **1.4 Analysemetode**

I denne studien skulle ulike neurotransmittere separeres og kvantifiseres ved bruk av væskrokromatografi koblet med massespektrometri. I dette kapitlet beskrives denne teknikken, og spesifikke instrumentelle forhold som ble benyttet.

### **1.4.1 Omvendt fase kromatografi**

For å separere analytter blir ofte omvendt fase (RP) kromatografi ofte benyttet. Ved RP separasjon er stasjonærfasen (SP) lipofil/upolar og mobilfasen (MP) hydrofil/polar. Ved anvendelse av et slikt system vil upolare stoffer ha størst affinitet mot SP og ha størst retensjon. SP som benyttes er som oftest modifisert silika. Til denne er det bundet langkjedede alkylgrupper, substituerte alkylgrupper eller andre hydrokarboner. Mobilfasen er som oftest en blanding av vann med kontrollert pH og et fullstendig vannløselig løsemiddel som metanol eller acetonitril. Gradienteluering brukes ofte fordi elueringstid og separasjon kan påvirkes i større grad enn ved isokratisk eluering. Da vil sammensetningen av mobilfasen endres under analysen slik at løsemiddelstyrken økes, og tilfredsstillende eluering og separasjon oppnås (Greibrokk et al. 2005, Harris 2007).

### **1.4.2 HILIC**

HILIC er et separasjonsprinsipp som benyttes til å separere hydrofile forbindelser som ikke har tilstrekkelig retensjon på et RP-system. HILIC-kolonner har en SP som er hydrofil, i tillegg er den ofte ladet. SP kan være silikageler, kjemisk bundne, zwitterioniske eller ionebyttere. Stoffer retarderes generelt sterkere på kolonnen jo mer hydrofile stoffene er. Det som skiller HILIC fra normal fase kromatografi er at det benyttes en semi-vandig mobilfase (Appelblad et al. 2008, Cavazzini og Felinger 2013). MP i HILIC kjennetegnes ved at den er mindre polar sammenlignet med SP. Ofte benyttes en MP som består av 10-40 % vandig buffer med en kontrollert pH og et organisk løsemiddel slik som acetonitril eller metanol, imidlertid brukes også etanol og 2-propanol (Moldoveanu og David 2013a). Løsemiddelstyrken i HILIC er som følger:

Vann > metanol > etanol > 2-propanol > acetonitril > aceton > tetrahydrofuran

Gradientseparasjoner med HILIC starter av denne grunn med en mobilfase med lavt vanninnhold, hvor andelen vann økes gradvis for å eluere sterkt retarderte analytter. Ved HILIC benyttes en lavere andel vann i mobilfasen sammenlignet med RP, dette kan gi problemer med hensyn på bufferløselighet. En buffer med god løselighet i større andeler organisk løsemiddel er nødvendig for separasjoner ved HILIC. Ammoniumacetat eller ammoniumformat er foretrukne valg fremfor fosfater. Konsentrasjonsintervallet som ofte brukes i bufferne er mellom 5 til 20 mM. Buffernes pH verdier begrenses av SP natur og bæreparkikkel, men befinner seg ofte mellom 2 og 8 (Moldoveanu og David 2013a) og måles i den vandige fasen.

Acetonitril (ACN) er det foretrukne løsemidlet i HILIC, ettersom andre løsemidler kan medføre for liten analyttretensjon eller brede usymmetriske topper. Ved gradienteluering, hvor det benyttes to løsningsmidler A og B, bør begge løsningene inneholde den samme bufferen. Dette skyldes at ved bruk av to mobilfaser hvor A er hovedsakelig organisk og B er hovedsakelig vandig, vil innholdet av den tilsatte bufferen kunne endres, og det vil kunne skje forandringer i pH eller ionestyrke. Dette kan gi endringer i retensjonsmekanismen (Moldoveanu og David 2013a). Grunnet den store andelen organisk løsemiddel som benyttes er HILIC veldig godt egnet til MS og kan sammenlignet med RP gi en økning i følsomhet på 10-1000 ganger for hydrofile analytter (Appelblad et al. 2008).

Det som skiller HILIC fra andre separasjonsprinsipper er at MP er en integrert del av SP. Under forholdene som brukes ved HILIC legger det seg et tynt lag beriket med vann adsorbent på SP. Retensjonsmekanismen i HILIC blir fortsatt debattert, men den mest aksepterte modellen beskriver at separasjonen skjer ved at analytt fordeles mellom eluenten og det vannrike laget immobilisert på stasjonærfase. Primærfunksjonen til SP i HILIC er derfor å binde vann, og det er ytterst viktig at mengden vann i mobilfasen er innenfor visse grenser ( $\approx 3-60\%$ ). Retensjonen blir også påvirket av adsorpsjon via hydrogenbindinger og flere mulige elektrostatiske og ioniske sekundære interaksjoner mellom analytten og SP. For å bryte de elektrostatiske kreftene mellom stasjonærfase og analytt er det nødvendig at mobilfasen også inneholder et salt eller en buffer (Appelblad et al. 2008, Cavazzini og Felinger 2013, Tyteca et al. 2014).

### 1.4.3 Nullretensjonstid

Nullretensjonstiden til en kolonne er den tiden det tar for en uretardert forbindelse å passere gjennom kolonnen. I RP kromatografi omfatter dette som regel polare forbindelser som ikke har interaksjon med den upolare SP. Disse polare forbindelsene vil da elueres som en topp rundt nullretensjonstiden som ville kunne gi ioneundertrykking av analytter som elueres i dette området, kalt fronten. Nullretensjonstiden kan bestemmes eksperimentelt ved å injisere en polar forbindelse som ikke har retensjon på systemet.

Nullretensjonstiden kan også estimeres teoretisk ved bruk av ligningen for mobilfaseporøsitet, se formel 1.

$$\varepsilon_t = \frac{F \cdot t_M}{1/4\pi \cdot D^2 \cdot L} \quad (1)$$

I formel 1 er  $\varepsilon_t$  mobilfaseporøsitet (fraksjonen av mobilfase som opptar porer og mellomrom mellom partikler i kolonnen) som er en dimensjonsløs parameter, D er kolonnediameter, L er kolonnens lengde, F er volumetrisk strømningshastighet (mL/min) og  $t_M$  = nullretensjonstiden.

### 1.4.4 Ultrahøytrykks væskekromatografi

Ultrahøytrykks væskekromatografi (UHPLC) er et resultat av utviklingen av instrumentering og kolonneteknologi innenfor HPLC (High performance liquid chromatography). Prinsippet er det samme, men oppløsningen, analysetiden og sensitiviteten er bedre enn ved HPLC (Grumbach et al. 2009). Instrumentelt sett er ulikhetene i hovedsak at UHPLC benytter kortere kolonner (3-10 cm) og mindre partikkelstørrelse i stasjonærfasematerialet (1,5-2  $\mu\text{m}$ ). Fordi små partikler øker mottrykket i kolonnen, er også instrumenteringen designet for å tåle trykk opptil 1000 bar (Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2010).

Utvikling av stasjonærfasemateriale for å øke effektiviteten førte til fremskritt i HPLC-teknologi. Prinsippene utviklingen hviler på er gitt ved Van Deemters ligning som beskriver forholdet mellom lineær strømningshastighet og platehøyde. I ligningen er platehøyde et mål på en kolonnes effektivitet. Ligningen gir at platehøyden minker ved mindre partikkeldiameter. Dette gir en økning i platetallet og kolonnens effektivitet. Ettersom

optimal mobilfasehastighet er omvendt proporsjonal med partikkelstørrelse, øker optimal mobilfase hastighet jo mindre partiklene blir. Dette krever et system som er designet for meget høye trykk (Swartz 2005).

Oppløsningen til en kolonne er proporsjonal med kvadratroten av platetallet. Platetallet til en kolonne er igjen proporsjonalt med lengden av kolonnen og inverst proporsjonal med partikkelstørrelse. Grunnet dette kan kolonnelengden forkortes ved samme faktor som partikkelstørrelse uten at oppløsningen minker. Ved anvendelse av en mobilfasehastighet som er f.eks tre ganger høyere grunnet de små partiklene, og en tredjedels forkortning av kolonnen, kan separasjonen utføres på en niendedel av tiden, samtidig som oppløsningen er like god (Swartz 2005, Arsenault og McDonald 2007, Grumbach et al. 2009).

Ved UHPLC kreves pumper som har kapasitet til å levere løsemiddel jevnt og reproducerbart ved høye trykk (1000 bar). Pumpene må også kunne kompensere for komprimering av løsemiddel under kjøring i både isokratisk- og gradientseparasjon (Swartz 2005).

Partikkelstørrelsen ved UHPLC er vanligvis 1,8  $\mu\text{M}$  og den høye effektiviteten gir også detektoren en utfordring. De kromatografiske toppene kan få en bredde ved halv topphøyde på under ett sekund. For å kunne integrere toppene på en nøyaktig og reproducerbar måte, må detektorhastigheten være høy nok til å registrere nok datapunkter langs toppen (Swartz 2005)

#### **1.4.5 MS**

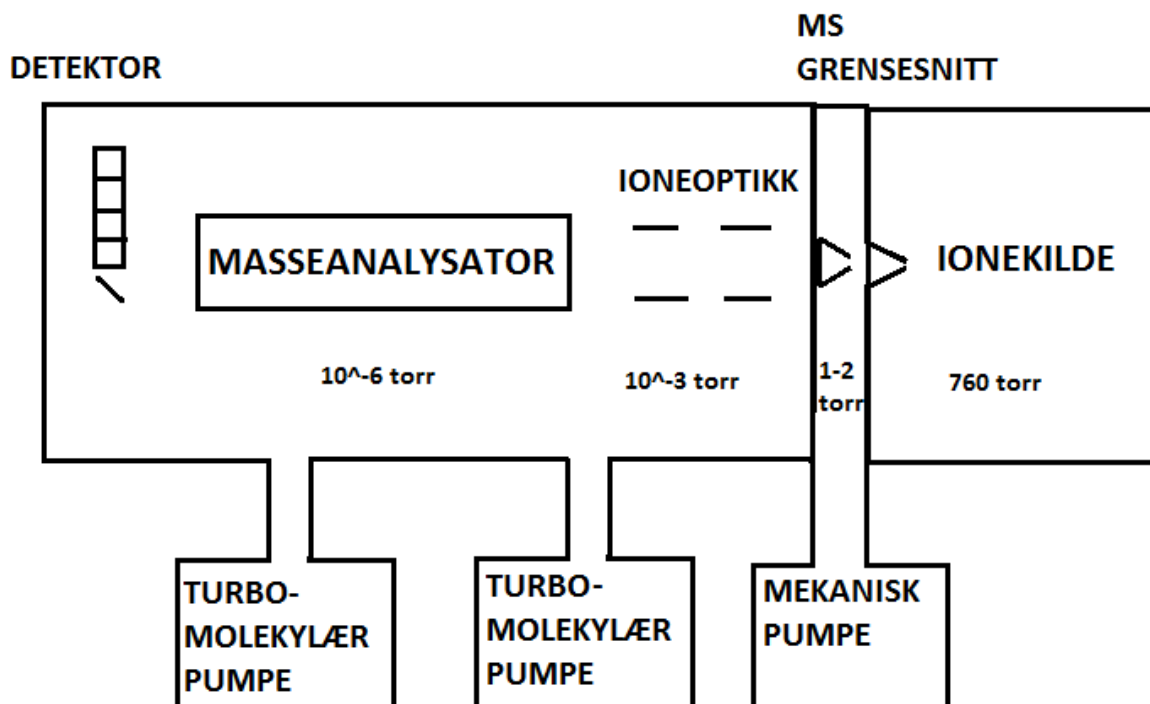
MS blir mye brukt som detektor innenfor kromatografiske metoder. MS er en teknikk som kan benyttes til mange ulike formål; blant annet identifikasjon, strukturbestemmelse og massebestemmelse av atomer, molekyler eller fragmenter av molekyler. For at stoffer skal kunne analyseres med et massespektrometer må de først overføres til gassfase og ioniseres i en ionekilde. Ionisering av stoffene kan gjøres ved ulike teknikker. Ionene som dannes blir deretter separert ved bruk av en masseanalysator. Separasjonen skjer på grunnlag av ionenes forhold mellom deres masse ( $m$ ) og formelle ladning ( $z$ ),  $m/z$ . Forholdet mellom  $m$  og  $z$  kalles massetall (Cole 1997, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2010).

Etter at ionene har blitt separert og uønskede ioner filtrert bort i masseanalysatoren, registreres de av en detektor. Signalet detektoren tar opp overføres til en datamaskin som



bearbejder informasjonen og konstruerer et massespekter. Massespekteret viser en grafisk fremstilling av antallet ioner som er detektert ved de forskjellige massetallene (Cole 1997, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2010).

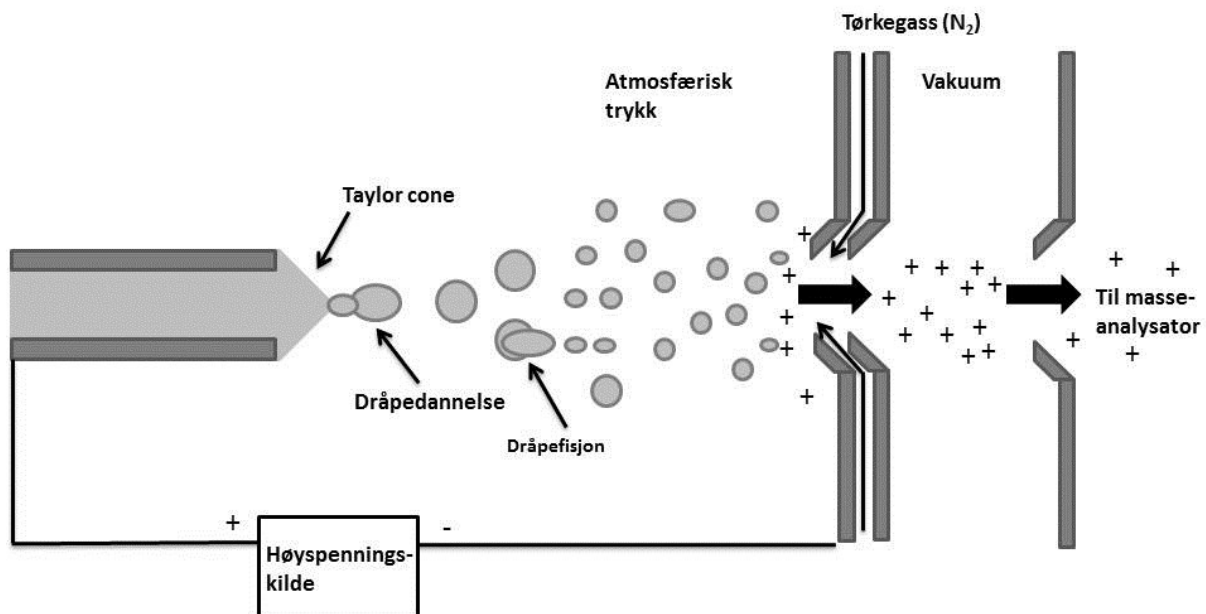
Når MS kobles med LC overføres analyttene fra væske til gass ved atmosfærisk trykk (760 torr) i ionekilden. I MS er det imidlertid vakuum ( $10^{-6}$  torr) slik at ionene ikke kolliderer med andre molekyler og fragmenteres før de når detektor. Denne store trykkforskjellen kontrolleres ved et effektivt pumpesystem bestående av mekaniske pumper i samspill med turbomolekylære, diffusjons eller kryogeniske pumper (de Hoffmann og Stroobant 2007). Figur 6 viser hvordan ionene føres fra atmosfærisk trykk i ionekilden til vakuum i masseanalysatoren. Etter at ionene har blitt overført til gassfase i ionekilden føres de inn i MS via grensesnittet hvor det holdes et vakuum på 1-2 torr. Grensesnittet består som regel av to kjegler av metall (som regel nikkel) med hull i midten, heretter kalt en cone, som ionene passerer gjennom. For at ionene skal holdes i en sentrert stråle og ikke kolliderer med bestanddeler i MS før de når masseanalysatoren føres de gjennom et kammer med elektrostatiske linser, kalt ioneoptikk, som fokuserer ionene. Vakuum i ioneoptikken holdes som regel rundt  $10^{-3}$  torr. De elektrostatiske linsene hindrer også at nøytraler, fotoner og andre uønskede forbindelser når detektor. Ionestrålen med analytter og matriksioner føres så inn i masseanalysatoren hvor vakuum er omkring  $10^{-6}$  torr (Thomas 2008).



Figur 6: Grunnleggende bestanddeler i et MS-instrument, hvor trykkene i de ulike komponentene er markert.

#### 1.4.5.1 Elektrosprayionisasjon

Når et massespektrometer brukes som detektor ved væskechromatografi er elektrosprayionisasjon (ESI) en utbredt ioniseringsmetode. ESI gir liten grad av fragmentering, ettersom energien tilføres gradvis ved termisk energi. Ved ESI føres mobilfasestrømmen fra kolonnen gjennom et tynt metallkapillær. Ved utløpet av kapillæret, nær tuppen, er det påsatt et elektrisk potensiale på 2-5 kV. I det sterke elektriske feltet vil ionene migrere mot en motelektrode, og væsken vil danne en kjegleform ved utløpet av kapillæret kalt en «taylor cone» når det elektriske feltet er stort nok. Væsken forstøves og det blir dannet små væske-dråper med høy elektrisk ladning. En inertgass som  $N_2$  tilsettes for at løsemiddelet skal fordampe raskt. Ionene overføres til gassfase ved fordampning av løsemiddel og kontinuerlig dråpefisjon. Når alt løsemiddel er fordampet vil det bare være frie ioner i gassfase. Dette skjer ved atmosfærisk trykk, og kalles derfor atmosfærisk trykk ionisasjon. Potensialer i ESI-enheten kan settes til positive eller negative potensialer og på denne måten er det mulig å velge mellom å analysere kationer eller anioner (Cole 1997, Lim og Lord 2002, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004). En prinsippsskisse av ESI er gitt i figur 7.

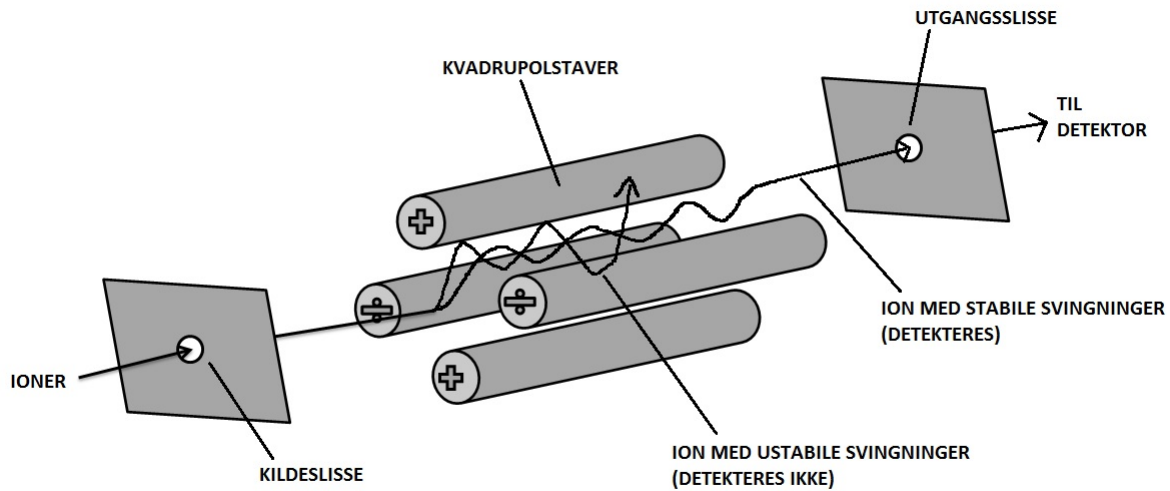


Figur 7: Prinsippskisse av elektrospay. Ionene vil vandre i det elektriske feltet mot motelektroden. Hvis det elektriske feltet er stort nok danner væsken ved utløpet av kapillæret en kjegleform kalt en Taylor cone. Når de frastøtende kreftene mellom ionene er like store som overflatespenningen til løsningsmiddelet skjer det dråpefisjon fra Taylor cone. Frie ioner i gassfase dannes ved kontinuerlig fordampning av løsningsmiddelet og dråpefisjon.

#### 1.4.5.2 Kvadrupol masseanalysator

Masseanalysatorer av kvadrupoltypen blir ofte benyttet. Kvadrupolen består vanligvis av fire parallelle hyperbolske eller sylindriske staver oppstilt i et firkantmønster (se figur 8). I masseanalysatoren føres ionene fra ionekilden inn i et oscillerende elektrisk felt. Stavene er parvis påsatt like elektriske potensialer. Ionene begynner å bevege seg oscillerende når de kommer inn i feltet. Ioner med bestemte massetall vil få stabile svingninger og føres gjennom kvadrupolen. Alle andre ioner vil få oscillasjoner med en høyere amplitude, slik at de til slutt vil kollidere med en av stavene og nøytraliseres. De kommer ikke gjennom massefilteret. Det kan fortløpende bestemmes hvilke ioner som skal få stabile oscillasjoner og slippe igjennom filteret ved å sveipe over det elektriske feltet. De fleste kvadrupolinstrumenter kan skanne over hele sitt område (0-4000  $m/z$ ) iløpet av få

millisekunder (Poole 2003, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen 2004, de Hoffmann og Stroobant 2007).



Figur 8: Prinsippskisse av et massefilter av kvadrupoltypen. Ioner med bestemte massetall vil få stabile svingninger og detekteres. Alle andre ioner vil få ustabile oscillasjoner, kollidere med en av stavene og nøytraliseres.

### 1.4.5.3 MS/MS og trippel kvadrupol

MS/MS er instrumenter med en enkelt ionekilde og to masseanalytatorer, separert ved en kollisjonscelle. Ved MS/MS skjer masseanalysen i minst to trinn; et bestemt ion isoleres i det første trinnet. Deretter fragmenteres ionet videre til datterioner i kollisjonscellen, som analyseres i det andre MS-trinnet (Poole 2003, de Hoffmann og Stroobant 2007).

Massespektrometre av typen trippel kvadrupol er på vei til å bli et standard analytisk verktøy innenfor LC-MS/MS der nøyaktig kvantifisering er nødvendig. En trippel kvadrupol består av en lineær kombinasjon av tre kvadrupol masseanalytatorer. Det er bare den første og den tredje kvadrupolen som har egenskapen til å sveipe over det elektriske feltet. Kvadrupolen i midten, som også kan være en multipol, sender bare ut radiobølgefrequenser og er en gassfylt kollisjonscelle som fragmenterer ionene før de sendes videre til analyse i den tredje kvadrupolen (Poole 2003, de Hoffmann og Stroobant 2007, Gross 2011).

Det er mulig å bruke ulike sveipemoduser når tre kvadrupoler settes i serie på denne måten. En av de mest brukte er selektert reaksjonsmonitorering (SRM). Ved SRM velges en eller flere spesifikke fragmenteringsreaksjoner hvor molekylionene, også kalt moderionene,

isoleres i den første kvadrupolen, fragmenteres til såkalte datterioner i den andre, før ett eller flere utvalgte datterioner analyseres av den tredje kvadrupolen. Her detekteres kun molekylionene isolert i den første kvadrupolen dersom reaksjonen i den andre kvadrupolen gir et eller flere bestemte fragmenter. Når flere fragmenteringsreaksjoner overvåkes for et moderion kalles sveipemodusen ofte multipel reaksjons monitorering (MRM). Dersom flere datterioner isoleres for ett moderion oppnås større selektivitet (de Hoffmann og Stroobant 2007, Murray et al. 2013).

## **1.5 Bestemmelse av neurotransmittere**

Bestemmelse av neurotransmittere og metabolitter i biologiske prøver kan være en analytisk utfordring. En av grunnene til dette er at neurotransmittere, som eksempelvis katekolaminene DA og NE eksisterer i fri form i svært lave konsentrasjoner i biologiske prøver (Fotopoulou og Ioannou 2002). Dette krever en bioanalytisk metode som er spesifikk og har svært god følsomhet. Neurotransmittere er også ustabile; de kan oksidere spontant, dekomponerer lett ved høy pH (Rosano et al. 1991) og er lyssensitive.

Tidligere ble neurotransmittere bestemt ved bruk av radioenzymatiske og immunologiske metoder, gasskromatografi og fluorimetri, men disse metodene har i stor grad blitt erstattet av LC metoder (Quaiserová-Mocko et al. 2008). Bestemmelse av neurotransmittere gjøres vanligvis med LC (eller kapillærelektroforese) koblet til ulike deteksjonsmetoder, slik som ultrafiolett (UV) deteksjon, fluorescensdeteksjon (FLD), elektrokjemisk deteksjon (ECD) og MS. De ulike metodene har ulike begrensninger ved biologiske analyser (Cai et al. 2010). Teknikkene er også for lite selektive, sensitive eller reproducerbare. ECD påvirkes lett av støy som kan medføre økning i signal til støyforhold (S/N) og variasjon i målinger. Dersom katekolaminer og aminosyrer skal detekteres med FLD må også tidkrevende derivatisering utføres (Zapata et al. 2001, Wang et al. 2012, Bicker et al. 2013). LC-MS/MS er blitt en av de kraftigste analytiske teknikkene ved bioanalyser fordi metoden har fordeler som høy følsomhet og selektivitet, og har blitt brukt til å bestemme neurotransmittere i ulike biologiske matrikser (Wang et al. 2012). En oppsummering av konsentrasjoner av neurotransmitterne og metabolittene som har blitt målt i mikrodialysat og hjernevev av andre ved LC i kombinasjon med MS/MS og andre detektorer er gitt i tabell 3.

Tabell 3: Oppsummering over konsentrasjoner og konsentrasjonsnivåer som har blitt målt i hjernevev og mikrodialysat fra ulike hjernedeler ved LC-MS/MS. Alle verdier er hentet fra boken *Liquid chromatography* (Bosse et al. 2013), og målt med LC-MS/MS med mindre annet er oppgitt.

Analytt	Materiale	Art	Konsentrasjon eller konsentrasjonsområde i hjernedeler	Kommentar
DA	Hjernevev	Rotte	0,1 µg/g (PFC), 5,9 µg/g (DS), 1,6 µg/g (NAc)	
	Mikrodialysat	Rotte	0,47-8 nM (NAc), 2 nM (DS), 2,2 nM (PFC), 3 nM (PFC)	
3-MT	Hjernevev	Rotte	0,033 µg/g (NAc), 0,099 µg/g (DS) ( <i>Heal et al. 1990</i> )	Målt med LC-ECD
	Mikrodialysat	Rotte	Ikke detekterbar (PFC), 1,7 nM (NAc), 2,2 nM (VTA)	
HVA	Hjernevev	Rotte	Ikke detekterbar (PFC og DS), 0,8 µg/g (NAc)	
	Mikrodialysat	Rotte	49 nM (PFC), 0,7 µM (NAc), 0,12 nM (VTA)	
DOPAC	Hjernevev	Rotte	Ikke detekterbar (PFC og DS), 1,6 µg/g (NAc)	
	Mikrodialysat	Rotte	110 nM (PFC), 0,8 µM (VTA), 5 µM (NAc)	
NE	Hjernevev	Rotte	0,27 µg/g (DS) ( <i>Yoshitake et al. 2004</i> ), 1,77 µg/g (helhjerner) (Su et al. 2009)	Målt i DS med LC-FLD
	Mikrodialysat	Rotte	1,4 nM (PFC), 2,0 nM (VTA), 2,0 (NAc)	
5-HT	Hjernevev	Rotte	0,6 µg/g (PFC), 0,7 µg/g (DS), 1,6 µg/g (NAc)	
	Mikrodialysat	Rotte	0,4 nM (PFC) 0,5-2 nM (NAc) (Bosse et al. 2013) 0,4-2,1 nM (DS) ( <i>Uutela et al. 2009</i> )	
5-HIAA	Hjernevev	Rotte	0,2 µg/g (PFC), 0,3 µg/g (DS), 0,6 µg/g (NAc)	
	Mikrodialysat	Rotte	0,26 µM (PFC), 0,67 µM (NAc) 1,1 µM (VTA)	
ACh	Hjernevev	Mus	13,3 (PFC), 31,8 nmol/g (DS) ( <i>Bogen et al. 2009</i> )	Målt med LC-FLD
	Mikrodialysat	Rotte	0,8-3,9 nM (PFC), 0,2-3 nM (DS), 8 nM (VTA), 15 nM (NAc)	
Glu	Hjernevev	Mus	9,18 µmol/g (DS), 11,1 µmol/g (PFC) ( <i>Bogen et al. 2009</i> )	Målt med LC-FLD
	Mikrodialysat	Rotte	0,7 µM (PFC), 0,9 µM (VTA), 1,9 µM (NAc), 436,4 nM (over DS)	
GABA	Hjernevev	Mus	1,81 µmol/g (PFC), 2,07 µmol/g (DS) ( <i>Bogen et al. 2009</i> )	Målt med LC-FLD
	Mikrodialysat	Rotte	0,03 µM (NAc), 0,04 µM (VTA), 44 µM (PFC), 35,7 nM (over DS)	

## 1.6 Mål med oppgaven

Inntak av rusmidler endrer signaliseringssystemet av neurotransmittere i hjernen. Ved avdeling for rusmiddelforskning og metodeutvikling ved FHI utføres forskning på effekter av ulike rusmidler bl.a. ved rusmiddeleksponering av forsøksdyr. Målet med denne masteroppgaven var å utvikle og validere en UPLC-MS/MS metode for bestemmelse av neurotransmitteren 5-HT og 5-HT-metabolitten 5-HIAA i mikrodialysat. Det skulle også undersøkes om NE, GABA, Glu og ACh kunne inkluderes i metoden. Metoden skulle tilpasses analyse av mikrodialysat fra rotte og validering utføres i tråd med rettskoksikologiske retningslinjer.

FHI har tidligere utviklet en UPLC-MS/MS metode for analyse av DA i mikrodialysat fra rotte og underveis i metodeutviklingen ble det besluttet at det var hensiktsmessig å inkludere DA og DA-metabolittene DOPAC, HVA og 3-MT i analysemetoden for å få et mer helhetlig bilde av effekten av rusmidler på neurotransmitternivå. Det var ønskelig å utvikle en metode for bestemmelse av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i hjernevev, samt måle nivå av neurotransmitter og neurotransmittermetabolitter i mikrodialysat og hjernevev etter eksponering med rusmiddel.

Konsentrasjonen av neurotransmittere i mikrodialysat er svært lave og ligger som regel i subnanomolarområdet (Bosse et al. 2013) (tabell 3 i kapittel 1.5) og det ble derfor brukt svært følsom instrumentering ved utvikling av metoden.

## 2. EKSPERIMENTELT

### 2.1 Kjemikalier

Serotonin hydroklorid (100 %), 5-HIAA (99,5 %), 3-MT hydroklorid (95,5%), acetylkolin klorid (100 %), L-glutaminsyre (99,6%) og GABA (99 %) ble kjøpt fra Sigma-Aldrich (MO, USA) og L-noradrenalin HCl (99,4%), dopamin HCl (99,7%) og DOPAC ( $\geq 96,0\%$ ) ble kjøpt fra Fluka Chemika (Sveits) og HVA ( $\geq 99$  %) fra Fluka Biochemica (Østerrike). 3,4-dihydroksybensylamin (DHBA) hydrobromid ( $\geq 98$  %) ble kjøpt fra Fluka (Steinheim, DE), dopamin- $d_3$  hydroklorid (2-(3,4-dihydroksyfenyl- $d_3$ )etylamin hydroklorid) (99 %) ble kjøpt fra Chiron AS (Trondheim, NO) og GABA- $d_6$  (4-aminobutansyre-2,2,3,3,4,4- $d_6$ ) (99 %) (Isotech, Sigma-Aldrich), dopamin- $^{13}C_6$  hydroklorid (2-(3,4-dihydroksyfenyl- $^{13}C_6$ )etylamin hydroklorid) (99 %), serotonin- $d_4$  hydroklorid (3-(2-aminoetyl- $d_4$ )-1H-indol-5-ol hydroklorid) (98,7 %) og 5-HIAA- $d_5$  (5-hydroksyindole-4,6,7- $d_3$ -3-eddik-2,2- $d_2$  syre) (99 %) ble kjøpt fra C/D/N Isotopes Inc (Quebec, Canada). Ammoniumformat var fra BDH laboratory supplies (Poole, UK), ammoniumbikarbonat fra Sigma-Aldrich og ammoniumacetat, maursyre (98 %) og eddiksyre ( $>90$  %) ble anskaffet fra VWR international AS (Oslo, Norge). Ammoniakk-løsning (32 %) var fra Chemi-Teknik AS (Oslo, Norge) og askorbinsyre var fra Apotekproduksjon AS (Oslo, Norge). Acetonitril av HPLC-grad (FUV) var fra Lab-Scan (Gliwice, Polen) og metanol av LC-MS-grad ble anskaffet fra Chromasolv (Sigma-Aldrich). Natriumklorid, kaliumklorid og magnesiumklorid ble anskaffet fra VWR og kalsiumklorid 2-hydrat var fra Chemi-Teknik AS. Sukrose ble kjøpt fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Type 1 vann (18,2 M $\Omega$ ) renses med et Synthesis A 10 milli-Q system fra Millipore (Billerica, MA, US) og Optima LC/MS flaskevann fra Fisher Chemical (MA, US) ble brukt.

### 2.2 Forsøksdyr

C57BL/6-mus (7-8 uker gamle, 20-25 g, hannmus, Taconic, Ejby, Danmark) og Sprague Dawley-rotter (alder ikke oppgitt, 300 g, hanner, Taconic, Borup, Danmark) ble oppstallet ved FHI under standard betingelser (22  $\pm$  1  $^{\circ}C$ , 50  $\pm$  10 % luftfuktighet, lys på mellom kl 07.00-19.00). Alle studier med forsøksdyr tilknyttet denne masteroppgaven ble ledet og utført av forskere ved FHI. Studiene var godkjent av Forsøksdyrutvalget før oppstart og ble utført etter nasjonale retningslinjer.



## **2.3 Løsninger**

### **2.3.1 Stamløsninger**

Stamløsninger av neurotransmitterne og neurotransmittermetabolitter ble tillaget ved å løse 5-HT hydroklorid, 5-HIAA, 3-MT hydroklorid, ACh klorid, L-Glu, GABA, DA hydroklorid, DOPAC og HVA i volumer med MeOH/25 mM FA (pH = 2,5) (30/70, v/v) som ga en konsentrasjon på ca. 1000 µM. Løsningene ble oppbevart i brunfargede eller tildekkede målekolber i kjøleskap ved 4 °C. Siden flere av stoffene ikke lot seg løse i vandig 25 mM FA ble 30 % MeOH tilsatt. Løsningene ble laget i brunfargede/tildekkede målekolber fordi katekolaminer er lyssensitive og lett oksiderbare (Bicker et al. 2013).

### **2.3.2 Standarder**

I innledende forsøk med RP-LC ble standarder laget ved fortykning av stamløsningene med 25 mM FA, ammoniumformat pH 3,1, ammoniumacetat pH 5 eller ammoniumkarbonat pH 8. Ved innledende forsøk med HILIC ble standardløsningene laget ved fortykning med blandinger av løsninger nevnt over og ACN.

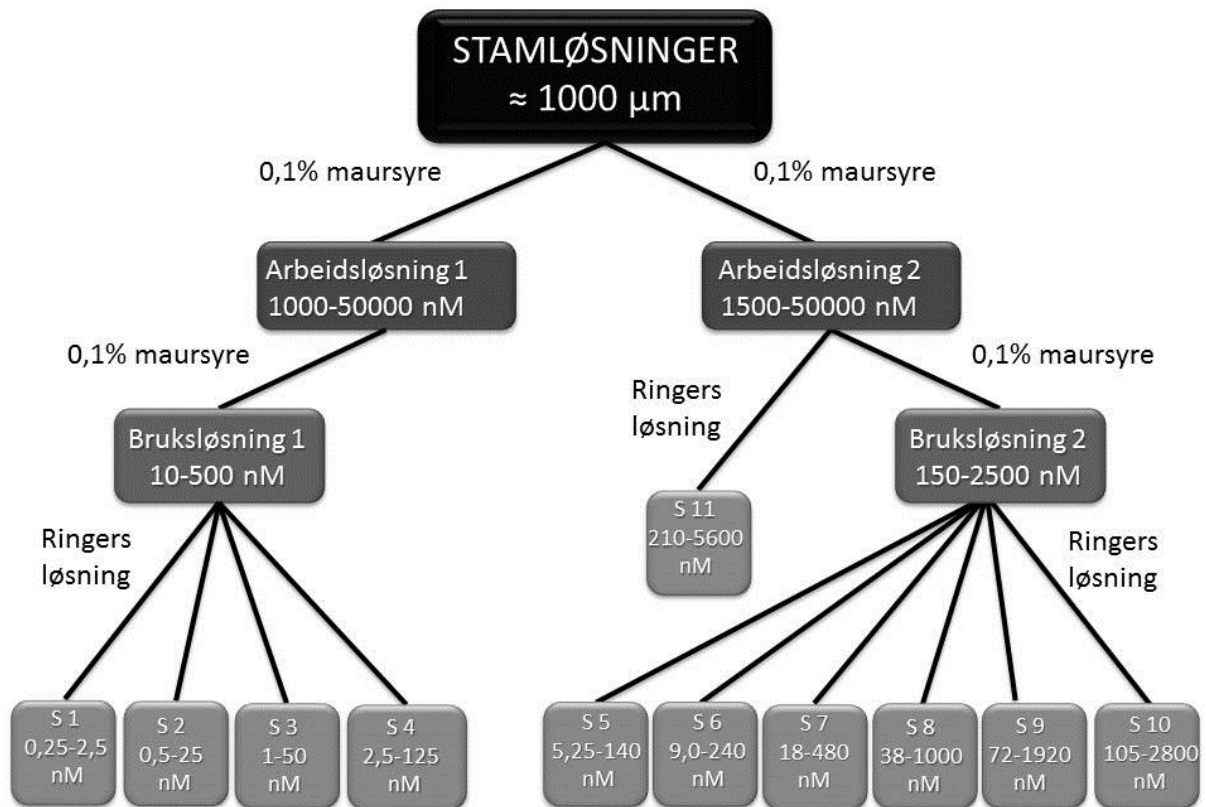
For studier av ulike fellingsmetoder for hjernehomogenat ble kalibreringsløsninger, heretter kalt kalibratorer, tillaget i 25 mM FA i konsentrasjonsområdet 0,35-7500 nM (se tabell 19 i kapittel 6.2.1 i appendiks).

### **2.3.3 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av mikrodialysat**

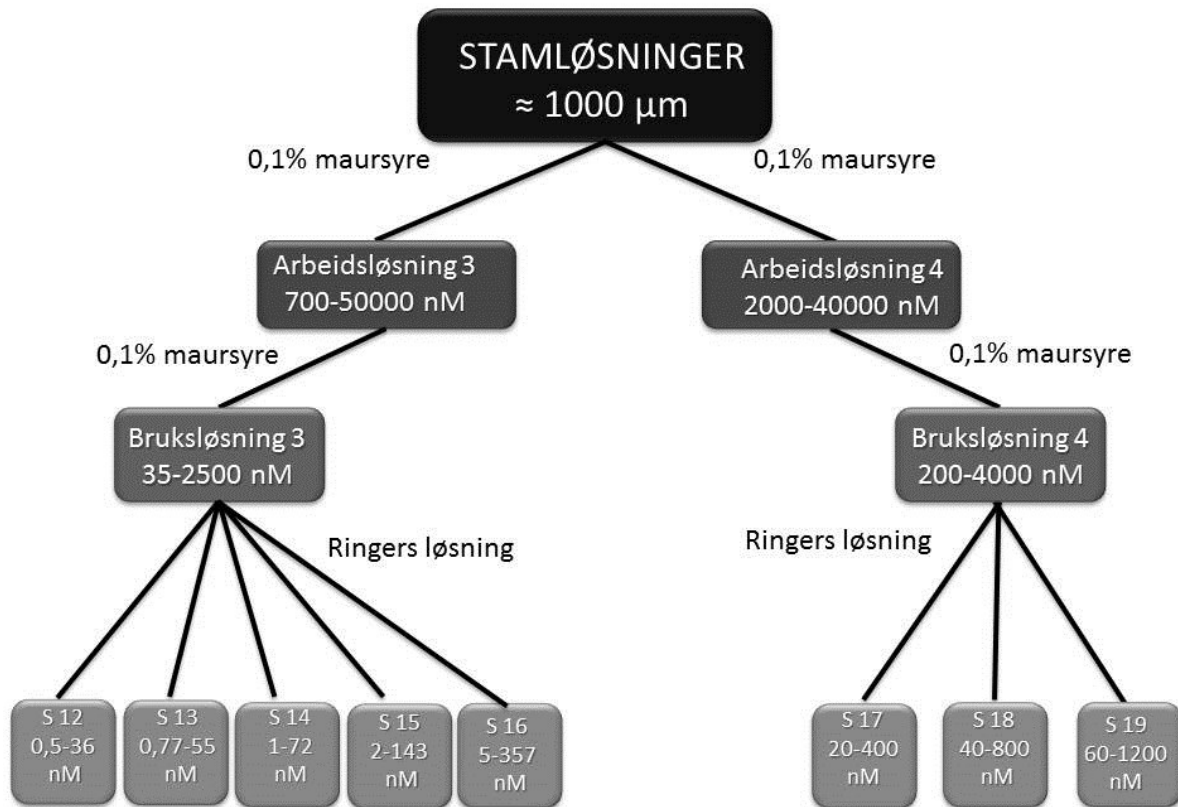
Standardløsningene som ble brukt til validering ble også brukt som kalibratorer og kontroller ved analyse av reelle prøver. Standarder, kalibratorer og kontroller til analyse ble laget ved fortykning av stamløsningene med 25 mM FA til arbeidsløsninger som så ble fortynnet videre til bruksløsninger. Bruksløsningene ble videre fortynnet med Ringers løsning til standarder/kalibratorer/kontroller (figur 9 og 10). Alle løsninger ble laget i målekolber oppbevart på is, i brunfargede eller tildekkede målekolber. Glu ble ikke tilsatt ved tillagning av arbeidsløsningene. En egen arbeidsløsning med Glu med en konsentrasjon på 50 µM ble tillaget i 25 mM FA, og tilsatt bruksløsningene.

Før hver analyse ble nye kalibratorer/standarder/kontroller laget fra bruksløsningene ved fortykning med Ringers løsning i 5 mL glassrør oppbevart på is. Det ble tatt hensyn til

neurotransmitternes lysfølsomhet ved å legge aluminiumsfolie over rørene. De nøyaktige konsentrasjonene i arbeidsløsninger, bruksløsninger og kalibratorer/standarder/kontroller er gitt i tabell 20-23 i kapittel 6.2.2 i appendiks.



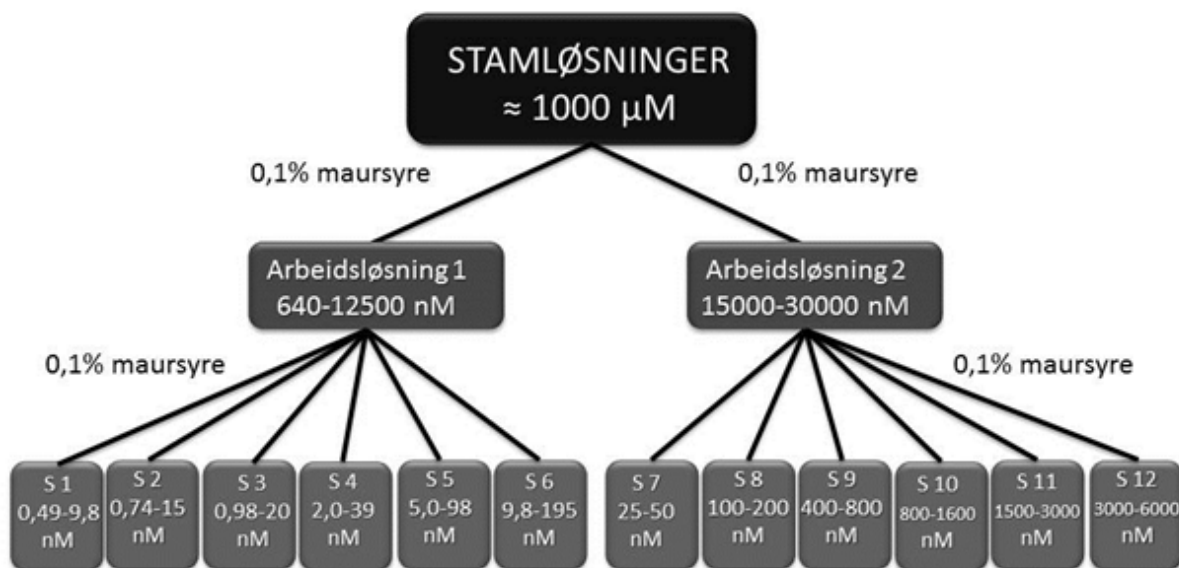
Figur 9: Flytskjema som viser hvordan stamløsningene over flere trinn ble fortynnet til standardløsninger(S)/kalibratorer samt konsentrasjonsområde for de ulike løsningene.



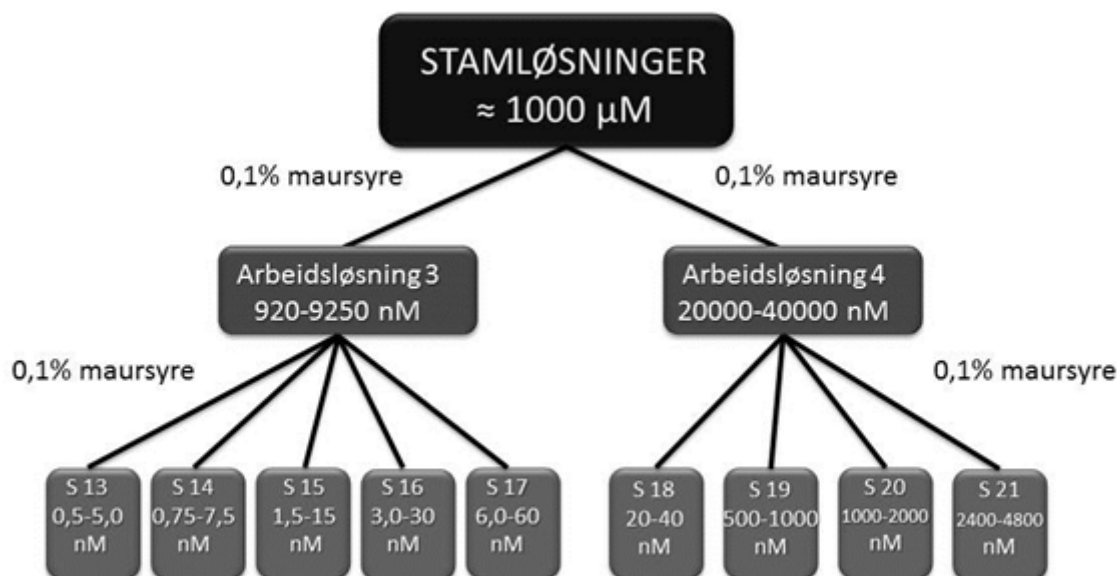
Figur 10: Flytskjema som viser hvordan stamløsningene over flere trinn ble fortynnet til standarder(S)/kontroller, samt konsentrasjonsområde for de ulike løsningene.

### 2.3.4 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av hjernevev

Standardløsningene som ble brukt til validering ble også brukt som kalibratorer og kontroller ved analyse av reelle prøver. Standarder, kalibratorer og kontroller ble tillaget ved fortynning av stamløsningene til arbeidsløsninger i 25 mM FA. Arbeidsløsningene ble deretter fortynnet videre til kalibratorer/kontroller/standarder i 25 mM FA (figur 11 og 12). Nøyaktige konsentrasjoner i kalibratorer/kontroller/standarder er gitt i tabell 24 og 25 i kapittel 6.2.3 i appendiks.



Figur 11: Flytskjema som viser hvordan stamløsningene over flere trinn ble fortynnet til standarder(S)/kalibratorer, samt konsentrasjonsområde for de ulike løsningene.



Figur 12: Flytskjema som viser hvordan stamløsningene over flere trinn ble fortynnet til standarder(S)/kontroller, samt konsentrasjonsområde for de ulike løsningene.

### 2.3.5 Internstandard

Stamløsninger av internstandard ble laget ved å veie inn DHBA hydrobromid, DA-d<sub>3</sub>, GABA-d<sub>6</sub>, dopamin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, serotonin-d<sub>4</sub> og 5-HIAA-d<sub>5</sub>, og løse alle stoffene i 25 mM FA/MeOH (70/30, v/v), med unntak av DHBA hydrobromid som ble løst i 0,12 mM askorbinsyre (pH=4,2).

Grunnen til at DHBA ble løst i askorbinsyre er at stoffet er kjent for å være stabil ved lav pH. Arbeidsløsninger ble laget ved fortynning av stamløsningene med 25 mM FA til 250  $\mu$ M for DHBA, GABA-d<sub>6</sub> og DA-d<sub>3</sub> og 200  $\mu$ M for DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, serotonin-d<sub>4</sub> og 5-HIAA-d<sub>5</sub>.

Ved tidspunktet for studier av ulike fellingsmetoder for hjernehomogenat (kap 2.6) var kun DA-d<sub>3</sub>, DHBA og GABA-d<sub>6</sub> tilgjengelig. Arbeidsløsninger med en konsentrasjon på 250  $\mu$ M ble tillaget i 25 mM FA, som deretter ble fortynnet til 5  $\mu$ M med 25 mM FA.

For analyse av mikrodialysat (kap 2.5) ble arbeidsløsningene brukt til å lage en blanding av internstandardene i 25 mM FA med en sluttkonsentrasjon på 400 nM for DHBA, GABA-d<sub>6</sub> og 5-HIAA-d<sub>5</sub>, og 200 nM for serotonin-d<sub>4</sub> og DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>.

For analyse av hjernevev fra PFC og DS (kap 2.8) ble arbeidsløsningene fortynnet med 25 mM FA til en blanding av DHBA, GABA-d<sub>6</sub>, 5-HIAA-d<sub>5</sub>, serotonin-d<sub>4</sub> og DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> med en sluttkonsentrasjon på 2,5  $\mu$ M.

For analyse av hjernevev av NAc ble arbeidsløsningene fortynnet med 25 mM FA til en blanding av DHBA, GABA-d<sub>6</sub>, 5-HIAA-d<sub>5</sub>, serotonin-d<sub>4</sub> og DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> med en sluttkonsentrasjon på 6  $\mu$ M.

## **2.4 Uttak av mikrodialysat etter perfundering med 6-MAM i rotte**

For perfundering av mikrodialyseprober og tillagning av standarder ble Ringers løsning brukt. Ringers løsning ble tillaget i type 1 vann med en konsentrasjon på 148 mM natriumklorid, 1,2 mM kalsiumklorid 2-hydrat, 2,7 mM kaliumklorid og 0,85 mM magnesiumklorid.

Uttak av mikrodialyseprøver ble utført av André Gottås, PhD ved FHI. Rotter ble operert under anestesi med isofluran og kroppstemperaturkontroll. To hull ble boret i skallen og to guidekanyler plassert i hjernedelene NAc og VTA. For å holde implantatet på plass ble en skrue festet i skallen og fiksert til skallen med tannsement. Etter operasjonen ble rottene behandlet med smertestillende, og plassert alene i preparerte bur og gitt daglig tilsyn for å unngå at implantatet ble ødelagt.

En uke etter operasjonen ble dyrene tilkoblet mikrodialyseutstyr under svak bedøvelse med isofluran. To mikrodialyseprober ble plassert i NAc (CMA 12 elite, metallfri, 2 mm, microdialysis, Sverige) og VTA (AT4.15.1.PES, cut-off 6 kDa, polyetersulfon membran, 1mm,

AgnThos, Sverige) via guidekanylene. Mikrodialyseprobene ble koblet via FEP (fluorinert etylen propylen)-rør til en svingarm festet til buret. En ståltråd ble koblet til implantatet i rottas skalle slik at bevegelsene til rotta ble overført til svingarmen og forhindret belastning av FEP-rørene (se figur 13). Innløpskanaler til probene ble forbundet med to sprøyte-pumper som pumpet Ringers løsning gjennom probene. Probenes utløpskanaler ble koblet til en nedkjølt fraksjonssamler hver. Perfusjonsstrømmen ble satt til 0,2  $\mu\text{L}/\text{minutt}$  over natten.

Påfølgende dag ble perfusjonsstrømmen økt til 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , og fraksjonssamler programmert til prøvetakningsintervaller på 5 minutter som ga et prøvevolum på 5  $\mu\text{L}$ . Prøver av basalnivå av ulike neurotransmittere i VTA og NAc ble samlet opp i ca. 30 min, før Ringers løsningen som ble pumpet inn i VTA proben ble byttet ut med 10  $\mu\text{M}$  av den aktive heroinmetabolitten

6-monoacetylmorfin (6-MAM). I NAc ble kun Ringers løsning tilført. Det ble deretter samlet opp prøver fra VTA og NAc i ca. en time. Forsøket ble avsluttet og rotta ble dypt anestesert med en blanding av ketamin og xylazin og koblet fra dialyseutstyret. Proben ble perfundert med metanolblått for å farge implantasjonsområdet i hjernen, slik at hjernen kunne kontrolleres for blødninger eller andre fysiske endringer rundt sonden som kunne ha påvirket dialysen. Etter avliving med en dødelig dose pentobarbital ble hjernen tatt ut.



**Figur 13:** En rotte koblet til mikrodialyseutstyr. Mikrodialyseprobene er koblet via FEP-rør til en svingarm, slik at rotta kan bevege seg rundt uten å belaste FEP-rørene. Ringers løsning blir pumpet gjennom en probe som er koblet til en fraksjonssamler.

## 2.5 Opparbeiding og analyse av mikrodialyseprøver

Brunfargede prøverør (02-CTVA, Chromacol) av glass ble merket, satt på is og tilsatt 5 µL IS og tildekket med aluminiumsfolie for å hindre dekomponering. Prøverørene ble brakt til dyrestallen hvor 5 µL prøve ble oppsamlet i hvert prøverør som ble holdt på is under hele forsøket. Dette ga en fortynningsfaktor på 2 for prøvene, og sluttkonsentrasjon av IS på hhv 200 nM for DHBA, GABA-d<sub>6</sub> og 5-HIAA-d<sub>5</sub>, og 100 nM for serotonin-d<sub>4</sub> og DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> i prøvene. Rørene ble korket og innholdet blandet med ristemaskin.

Kalibratorer og kontroller med konsentrasjoner som gitt i tabell 22 og 23 i kapittel 6.2.2 i appendiks ble tillaget på is i Ringers løsning som beskrevet i kapittel 2.3.3. 50 µL kalibrator og 50 µL kontroll ble pipettert over i brunfargede prøverør av glass på is, tilsatt 50 µL IS og korket. Dette ga tilsvarende fortynningsforhold og IS-konsentrasjon som i prøvene. En blindprøve og en nullstandardprøve ble analysert før kalibratorer og kontroller i hver serie. Blindprøven ble tillaget ved pipettering av 50 µL 25 mM FA og 50 µL Ringers løsning. Nullstandardprøven ble tillaget ved pipettering av 50 µL Ringers løsning og 50 µL IS.

Prøver, kalibratorer og kontroller ble satt i autoinjektor (temperatur = 6 °C) og 7 µL injisert og analysert med UPLC-MS/MS.

## 2.6 Proteinfelling av hjernehomogenat

Før proteinfelling ble 99,05 mg hjernevev fra DS homogenisert i 0,881 mL iskaldt type 1 vann og satt på is.

### 2.6.1 Proteinfelling med ACN/MeOH (85/15, v/v)

Fellingsmetoden med ACN/MeOH (85/15, v/v) ble utført som beskrevet av Karinen *et al.* (2009).

Seks replikater av 100 µL hjernehomogenat ble overført til 5 mL plastrør og tilsatt 20 µL 5 µM internstandard. Prøvene ble forsiktig ristet enkeltvis i ca. 10 sekunder. 500 µL ACN/MeOH (85/15) ble tilsatt rørene før de ble korket og ristet enkeltvis i ca. 20 sekunder. Rørene ble ristet i multivortexer (VX-2500, VWR) i 1 minutt, før de ble satt i fryser i minimum 10 min. Prøvene ble sentrifugert (Heraus Megafuge 16 R, Thermo Scientific) ved 4 °C og 3803 g (4500 rpm) i 10 min, og den organiske fasen (ca. 500 µL) overført til 5 mL glassrør. Organisk

fase ble dampet inn til tørrhet med nitrogen (95 % N<sub>2</sub>) i inndamper (Turbovap LV, Zymark) ved 40 °C i 45 minutter, og reløst i 100 µL kald 25 mM FA. Dette ga ingen fortykning av prøven og en sluttkonsentrasjon på 1 µM IS. Rørene ble korket og ristet på multiristemaskin i ca. 1 min, og deretter sentrifugert ved 4 °C og 4500 rpm i 10 min. Supernatanten ble overført til plastprøverør for autoinjektor (Polypropylenplast snap-top 300 µL, Waters) og korket.

Standarder (tabell 19 i kapittel 6.2.1 i appendiks) ble pipetert over i plastprøverør for autoinjektor. For blindprøve og nullstandard ble 100 µL 25 mM FA brukt. Standarder og nullstandard ble tilsatt 20 µL 5 µM internstandard, mens blindprøve ble tilsatt 20 µL 25 mM FA.

Prøver og kalibratorer ble satt i autoinjektor (6 °C) og 7,5 µL injisert og analysert med UPLC-MS/MS.

### **2.6.2 Proteinfelling med 0,25 M FA**

Fellingsmetoden med 0,25 M FA ble utført som beskrevet av González *et al.* (2011).

Seks replikater av 100 µL hjernehomogenat ble overført til eppendorfrør og tilsatt 100 µL 0,25 M FA og deretter 50 µL 5 µM IS før risting i 2 min. Dette ga en fortykningsfaktor på 2,5 og en sluttkonsentrasjon på hhv 0,1 M FA og 1 µM IS. Prøverørene ble sentrifugert i bord-eppendorfsentrifuge (Minispin plus, Eppendorf) i industrikjøleskap (ca. 4 °C) ved 14500 g (14500 rpm) i 20 min. Supernatanten ble overført til plastprøverør for autoinjektor og 7,5 µL injisert og analysert ved UPLC-MS/MS. Kalibratorer ble opparbeidet og prøver analysert som gitt i kapittel 2.6.1.

### **2.6.3 Proteinfelling med 5 % PCA**

Seks replikater av 100 µL hjernehomogenat ble overført til eppendorfrør og tilsatt 100 µL 5 % (w/w) PCA og 50 µL IS, og ristet i 2 minutter. Dette ga en fortykningsfaktor på 2,5, og en sluttkonsentrasjon på hhv 1 % PCA og 1 µM IS. Prøvene ble sentrifugert i 20 min ved 14500 g (14500 rpm) i bord-eppendorfsentrifuge (Minispin plus, Eppendorf) plassert i industrikjøleskap (4 °C). Supernatanten ble forsiktig overført til prøverør for autoinjektor og 7,5 µL injisert og analysert ved UPLC-MS/MS. Kalibratorer ble opparbeidet og prøver analysert som gitt i kapittel 2.6.1.



## 2.7 Uttak av hjerneprøver fra heroineksponerte mus

In vivo eksponering av mus og uttak av hjerneprøver ble utført av Inger Lise Bogen (forsker, FHI) og Anne Marte Sjursen Kvello (doktorgradsstipendiat, FHI).

En time før forsøket ble musene overført til lokomosjonskammer for tilvenning. Musene ble deretter eksponert for en enkeltdose heroin (25  $\mu\text{mol/kg}$ ) eller NaCl (0,9 %) injisert subkutant (i underhuden) (10 ml/kg). Umiddelbart etter injeksjonen ble musene flyttet tilbake til lokomosjonskammeret hvor musenes løpsaktivitet (lokomotorisk aktivitet) ble målt ved hjelp av et rutenett i bunnen av kammeret. Denne adferdstesten gir et mål på ruseffekt (Mørland et al. 1994). Musenes løpsaktivitet ble målt i nøyaktig 20 minutter, deretter ble musene avlivet med nakkestrekk og hjernen tatt ut. PFC ble dissikert med skalpell før NAc og DS ble tatt ut med 1 og 2 mm «stempler» på begge hjernehalvdeler. Hjernedelene ble overført til forhåndsveide eppendorfrør, raskt nedfrost i flytende nitrogen og satt i fryser ved  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  frem til homogenisering og prøveopparbeidelse samme dag.

## 2.8 Prøveopparbeidelse og analyse av hjernevev fra heroineksponerte mus

Forhåndsveide eppendorfrør med hjernevev ble tatt ut av fryser og satt på is. Rørene ble veid, mengden vev beregnet, og fra dette ble mengden iskaldt type 1 vann som skulle brukes til homogenisering beregnet.

Fordi NAc er et svært lite hjerneområde ble NAc homogenisert til mindre vekt pr volum (16,7 mg/mL) enn de større hjernedelene DS og PFC (50 mg/mL). Basert på tidligere erfaring ble det benyttet et homogeniseringsvolum på minimum 120  $\mu\text{L}$ . All homogenisering ble utført med en ultralydhomogenisator (VirSonic 300, Virtis).

100  $\mu\text{L}$  hjernehomogenat av DS og PFC ble overført til eppendorfrør og opparbeidet som gitt i kapittel 2.6.2. Dette ga en sluttkonsentrasjon på 20 mg hjernevev/mL.

100  $\mu\text{L}$  hjernehomogenat av NAc ble overført til merkede eppendorfrør og tilsatt 10  $\mu\text{L}$  1,2 M FA og 10  $\mu\text{L}$  6  $\mu\text{M}$  IS. Dette ga en fortynningsfaktor på 1,2, og en sluttkonsentrasjon på 14,2 mg hjernevev/mL type 1 vann, 0,1 M FA og 0,5 M IS. Resten av prøveopparbeidelsen ble utført som i kapittel 2.6.2.

For analyse av DS og PFC-prøvene ble 50 µL av kalibratorene og kontroller (tabell 24 og 25 i kapittel 6.2.3 i appendiks) overført til brune prøverør i glass for autoinjektor, tilsatt 25 µL IS og 50 µL 0,225 M FA. Dette ga en fortynningsfaktor på 2,5 og sluttkonsentrasjon på IS og FA (kalibratorene og standarder var løst i 25 mM FA) tilsvarende DS og PFC prøvene. For blindprøve og nullstandard ble 50 µL 25 mM FA pipettert. Nullstandard ble tilsatt 25 µL 5 µM IS og blindprøve ble tilsatt 25 µL 25 mM FA, før begge rørene ble tilsatt 50 µL 0,225 M FA.

For analyse av NAc-prøvene ble egne kalibratorene opparbeidet for slik å holde fortynningsforholdet identisk for prøver og kalibratorene. 100 µL kalibratorløsning ble tilsatt 10 µL IS og 10 µL 1,2 M FA (Det ble ikke korrigert for maursyre i kalibratorene da dette utgjorde kun 2,1 % av sluttkonsentrasjonen). Det ble ikke laget egen nullstandard og blindprøve for analyse av NAc, siden det var laget slike prøver for analyse av DS og PFC-prøvene.

Noen av prøvene fra PFC og NAc som var blitt felt med FA ble fortynnet 1/1000 med type 1 vann for bestemmelse av Glu og GABA.

Prøver, kalibratorene og standarder ble satt i autoinjektor (6 °C) og 7,5 µL injisert og analysert med UPLC-MS/MS.

## **2.9 UPLC-systemet**

Metodeutviklingen ble utført på fire ulike UPLC-instrumenter av samme type (Acquity UPLC, Waters) med injeksjonstårn, autoinjektor og binært pumpesystem koblet til tre ulike kvadrupol MS/MS systemer (Quattro Premier XE (Waters), Xevo TQ MS (Waters) og to UPLC-Xevo TQ-S (Waters)). I henhold til produsenten er Xevo TQ-S er ca. 10 ganger mer følsom enn Xevo-TQ, og at Xevo-TQ var mer følsom enn Quattro Premier XE. Alle instrumentene var utstyrt med et prøvehåndteringssystem med injeksjonsloop (10 µL) med unntak av det ene Acquity UPLC Xevo TQ-S instrumentene som hadde strømning-gjennom-nål injeksjon. Mikrodialysat ble analysert med Acquity UPLC Xevo TQ-S instrumentene og hjernevev ble analysert med Acquity UPLC Quattro Premier XE og Acquity UPLC TQS.

Separasjon av neurotransmittere ble utført på UPLC og HPLC kolonner med en mobilfasehastighet på 0,5 mL/min, kolonnetemperatur 65 °C og injeksjonsvolum 7,5 µL ved innledende forsøk og analyse av hjernevev, 7,0 µL ved analyse av mikrodialysat.

Injeksjonsmetoden som ble brukt var «partial loop needle overfill» (PLNO), som er passende når prøvolumet er begrenset ( $\leq 10 \mu\text{L}$ ). Ved bruk av Xevo TQ-S instrumentet uten loop, ble også dette volumet benyttet.

Ulike mobilfaser og kolonner ble undersøkt under utviklingen av metoden. Hvilke kolonner som ble brukt er gitt i tabell 4. Som mobilfase ble ammoniumacetat pH 5, ammoniumformat pH 3,1, ammoniumbikarbonat pH 8,5 og fortynnet FA testet i kombinasjon med MeOH eller ACN. Ammoniumformat, ammoniumacetat og ammoniumbikarbonat ble tillaget ved fortynning av stamløsningene med type 1 vann, og ved fortynning av konsentrert FA ved tillagning av maursyrebasert mobilfase.

**Tabell 4: Spesifikasjoner for kolonner undersøkt under metodeutviklingen.**

Kolonne	Stasjonærfase	Porestørrelse	Partikkelstørrelse	Dimensjoner	PH-område	Overflateareal
Waters Acquity UPLC HSS T3	C <sub>18</sub>	100 Å	1,8 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 100	2-8	230
Waters Acquity UPLC BEH	C <sub>18</sub>	130 Å	1,7 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 50	1-12	185
Waters acquity UPLC BEH Phenyl	Fenyl	130 Å	1,7 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 100 mm	1-12	185
Waters Acquity UPLC BEH amide	Amid	130 Å	1,7 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 50 mm	2-11	185
Waters Acquity UPLC BEH amide	Amid	130 Å	1,7 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 100 mm	2-11	185
Waters Cortecs UPLC HILIC	Silika	90 Å	1,6 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 100 mm	1-5	100
SeQuant ZIC-HILIC	Zwitterionisk	200 Å	3,5 $\mu\text{m}$	4,6 mm i.d. x 150 mm	3-8	-*
SeQuant ZIC-HILIC	Zwitterionisk	100 Å	3,5 $\mu\text{m}$	2,1 mm i.d. x 100 mm	3-8	-*

\*Ikke mulig å finne spesifikasjon. Produsent ble kontaktet, men kunne ikke oppgi noen verdi.

Hvilke MS-betingelser som ble benyttet under hele utviklingen og valideringen av metoden er gitt i tabell 5.

Tabell 5: Parametere benyttet i de ulike MS-komponentene

<b>IONEKILDE</b>	Conespenning (V)	MRM betinget
	Ekstraktor (V)	3,00
	Kildetemperatur (°C)	150
	Tørkegass-temperatur (°C)	450
	Tørkegass strømningshastighet (L/time)	1000
	Kollisjonsgass strømningshastighet (mL/min)	0,15
	Lav masse oppløsning kvadрупol 1	2,5
	Høy masse oppløsning kvadрупol 1	15,0
<b>MASSEANALYSATOR</b>	Ioneenergi 1	1,0
	Kollisjonsenergi	MRM betinget
	Lav masse oppløsning kvadрупol 2	2,8
	Høy masse oppløsning kvadрупol 2	14,7
	Ioneenergi 2	1,5
<b>DETEKTOR</b>	Multiplikator (V)	504

## 2.10 Bestemmelse av MS-overganger for analyttene

MS-overgangene i MRM for de ulike analyttene ble bestemt ved bruk av kombinert automatisk infusjon og manuell infusjon. Ved bestemmelse av MS-overganger i MRM for de ulike analyttene ble standardløsning fylt i glassprøverør med skrukork for autoinjektor (9mm prøverør, med slisse i PTFE/Sil septum, TruView LCMS Certified, Waters) og festet på innføringsrør på utsiden av MS. Monoisotopisk masse og et  $m/z$ -intervall omkring den angitte massen ble skrevet inn i programvaren (MassLynx V4.1, Waters) før en kombinert innføring av mobilfase og analytt ble startet. Dersom en topp ble synlig i massespekteret ved massen til molekylionet, ble en funksjon i programmet kalt Intellistart startet. Programmet finner den MRM overgangen, ladningsmodusen (negativ eller positiv modus), kollisjonsspenningen og conespenningen som gir høyest intensitet for moderion og datterion. Når Intellistart har funnet overganger og innstillinger skrives det ut en rapport med tilhørende massespektre, og en MS-fil og tune-fil lagres. MS-filen oppgir fragmentmassen og cone- og kollisjonsspenning. Tune-fil angir parametre som kapillærspenning, conegasshastighet, gasshastigheter og temperaturer i de ulike MS-komponentene.

Manuell infusjon ble utført for de analyttene hvor overganger ikke kunne finnes av programvaren. Dette ble utført på samme måte som automatisk infusjon, med unntak av at Intellistart ikke ble benyttet. Conespenning, og kollisjonsspenning ble endret manuelt, og de innstillingene og datterionene som ga høyest intensitet ble valgt og brukt videre.

Overgangene for enkelte av internstandardene ble funnet ved å legge til massen av antall deutererte eller  $^{13}\text{C}$  karbonatomer, og analysere ved samme innstillinger som den umerkede forbindelsen.

## 2.11 Kvantifisering og beregninger

For å kvantifisere nevrotransmitterne ble kalibreringskurver konstruert ved lineær regresjon i programmet MassLynx V. 4.1 med vekting på  $1/x$ . Kalibreringskurvene ble konstruert i programmet ved plotting av signal kalibrator/signal IS mot konsentrasjon kalibrator/konsentrasjon IS (konsentrasjon IS settes som regel til 1 ettersom alle prøver skal inneholde like mye IS). Bestemmelse av S/N ble også utført ved bruk av Mass lynx V.4.1.

## 2.12 Statistiske beregninger

Alle statistiske beregninger ble utført i Microsoft Excel 2010.

### 2.12.1 Uteliggertest

For å bestemme om noen verdier var uteliggere som burde fjernes før beregning av gjennomsnitt og statistikk, ble Grubbs test for uteliggere utført. G-verdien ble beregnet ved bruk av ligning 2.

$$G = \frac{|Verdi - Gjennomsnitt|}{Standardavvik} \quad (2)$$

G-verdien ble så sammenlignet med en tabell, hvor kritisk G-verdi er angitt for et gitt antall replikater. Hvis det eksempelvis ble målt på seks replikater, var  $G_{\text{Kritisk}} = 1.882$  ( $p=0,05$ ). Dersom verdien av G overskred  $G_{\text{Kritisk}}$  for et replikat, ble replikatet forkastet. De uteliggende verdiene ble fjernet fra datasettet, og standardavvik beregnet fra gjennomsnittsverdien uten uteliggere.  $G_{\text{kritisk}}$  verdier ble hentet fra (Boddy og Smith 2010).

### 2.12.2 Nøyaktighet og presisjon

Presisjon ble bestemt som relativt standardavvik, som beskriver avviket mellom de målte verdiene og gjennomsnittsverdien av målingene, gitt i prosent. Nøyaktighet (bias) ble bestemt som graden av overenstemmelse mellom gjennomsnittet av de målte verdiene og den teoretiske verdien, hvor 100 % tilsvarer fullstendig overenstemmelse.

### **2.12.3 T-test**

For å undersøke om biologiske analyser av neurotransmitternivå i mus eksponert for heroin eller NaCl var signifikant ulike ble t-test benyttet. T-test ble utført ved bruk av beregningsprogrammet Excel. Signifikansnivå ble satt til fem prosent ( $p < 0,05$ ).

### **3. RESULTATER OG DISKUSJON**

Hensikten med denne oppgaven var å lage og validere en analysemetode for bestemmelse av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i hjernevev og dialysat fra forsøksdyr. Tidligere utviklet metode ved FHI kunne bare bestemme DA i mikrodialysat. En fellingsmetode for hjernehomogenat skulle også undersøkes. De utviklede og validerte metodene skulle deretter testes ut ved analyse av reelle prøver fra rusmiddeleksponerte forsøksdyr.

#### **3.1 Metodeutvikling**

Ved utviklingen av metoden ble det lagt vekt på å separere analyttene fra de uorganiske saltene som finnes i ECV, ettersom konsentrasjonene av neurotransmitter i mikrodialysat er svært lave, og ioneundertrykking ville kunne medføre vanskeligheter ved deteksjon. Både RP og HILIC er mulig separasjonsprinsipper og ble derfor evaluert for å finne den best egnede metoden. Det var også viktig at analysetiden var så kort som mulig fordi det er sannsynlig at mange prøver med mikrodialysat eller hjernevev skal analyseres over et kort tidsrom. For å ta hensyn til de lave konsentrasjonene av neurotransmitter ble det mest følsomme instrumentet på laboratoriet brukt ved validering av mikrodialysatmetoden. Samtidig ble hele volumet av prøvene med mikrodialysat injisert, slik at mest mulig skulle komme frem til detektor, og gi høyest mulig signal.

##### **3.1.1 Optimalisering av MS-parametre**

Kapillærspenning kan ha stor betydning for effektiviteten av overgangen av ioner fra væske til gassfase i ESI, og derav gi økt signalstyrke. Jo høyere overflatespenning, jo mer påsatt spenning kreves (Cole 1997). Vandige mobilfaser krever høyest spenning. Ulike kapillærspenninger ble undersøkt i intervallet 0,6-5 kV i negativ og positiv modus for å undersøke hvilken spenning som ga høyest S/N. Fra målt topphøyde ble det funnet at en lav spenning på 0,6 kV ga høyest S/N og dette ble brukt i alle følgende forsøk.

Conegassen i ionekilden motvirker dannelse av klaseioner i ES. Det ble undersøkt om økte verdier av conegass ga mindre bakgrunnsstøy og høyere signal for analytt. Ved analyse ved ulike strømningshastigheter ble det ikke observert noen tydelig minking av bakgrunn.

Strømningshastigheten ble da satt til 60 L/time som ofte anvendes for de benyttede instrumentene.

### 3.1.2 Bestemmelse og optimalisering av MS-overganger

MS-overgangene i MRM for de ulike analyttene ble bestemt ved bruk av kombinert automatisk infusjon og manuell infusjon (tabell 6). Overgangene med høyest intensitet ble brukt til kvantifisering. Det ble observert at negative ioner ga lavere intensitet enn positive ioner ved samme konsentrasjon, selv etter optimalisering.

Tabell 6: MRM-overganger og optimaliserte innstillinger funnet for analyttene ved automatisk infusjon og manuell infusjon. Overgangene brukt til kvantifisering er understreket.

FORBINDELSE	MODERION (Da)	DATTERION (Da)	CONE (V)	KOLLISJON (V)	ES	KOMMENTAR
5-HT	177,1	132,0	14	20	+	Intellistart
	<u>177,1</u>	<u>160,0</u>	14	10	+	
5-HIAA	192,0	91,0	22	38	+	Intellistart
	<u>192,0</u>	<u>146,0</u>	22	16	+	
DA	153,9	91,0	20	28	+	Tidligere funnet ved FHI
	<u>153,9</u>	<u>136,8</u>	20	14	+	Intellistart
DOPAC	<u>167,1</u>	<u>123,0</u>	14	10	-	Intellistart
HVA	181,0	137,0	41	8	-	Manuell infusjon
	<u>181,0</u>	<u>122,0</u>	50	14	-	
3-MT	<u>168,0</u>	<u>119,0</u>	23	19	+	Intellistart
	168,0	91,0	35	22	+	
NE	<u>170,0</u>	<u>106,9</u>	10	18	+	Intellistart
	170,0	134,9	10	14	+	
ACh	146,2	60,0	20	10	+	Manuell infusjon
	<u>146,2</u>	<u>87,0</u>	20	14	+	
Glu	<u>148,0</u>	<u>84,0</u>	16	14	+	Intellistart
	148,0	101,9	16	12	+	
GABA	103,9	68,9	16	14	+	Intellistart
	<u>103,9</u>	<u>86,8</u>	16	8	+	
GABA d <sub>6</sub>	109,9	92,9	28	10	+	Intellistart
DA d <sub>3</sub>	156,9	94,0	20	28	+	Tidligere funnet ved FHI



FORBINDELSE	MODERION (Da)	DATTERION (Da)	CONE (V)	KOLLISJON (V)	ES	KOMMENTAR
DHBA	140,0	123,0	16	9	+	Manuell infusjon
DA <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	159,9	97,0	20	28	+	Instillinger tilsvarende umerket forbindelse
5-HIAA d <sub>5</sub>	197,0	151,0	22	16	+	
5-HT d <sub>4</sub>	181,1	164,0	14	10	+	

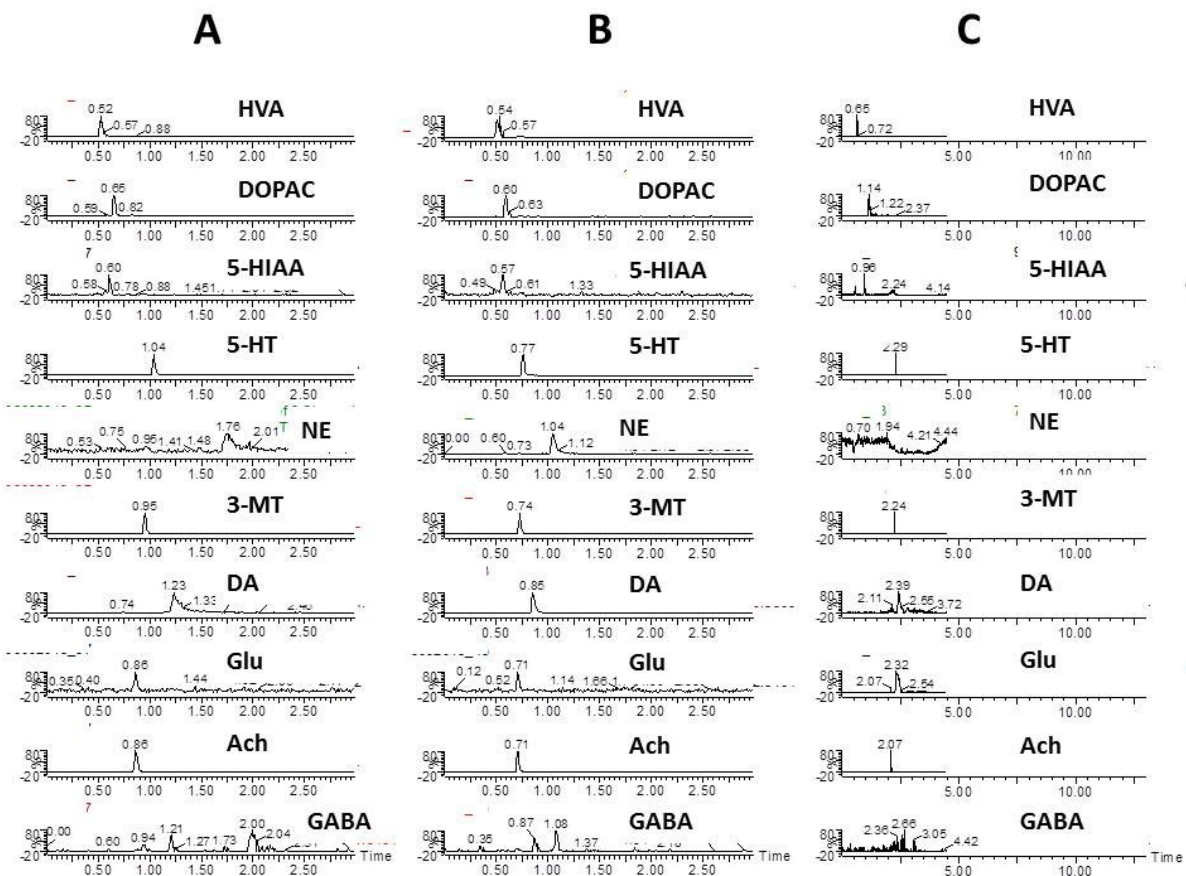
Fordi biologiske prøver inneholder mange ulike forbindelser er det hensiktsmessig å benytte to MRM overganger for å sikre at forbindelsen som kvantifiseres er analytten og ikke en annen forbindelse med likt fragmenteringsmønster. Kvadrupoler har lav masseoppløsning (2000) relativt til andre masseanalytatorer og oppløsningen kan teoretisk varieres mellom 0,3 og 3,0 amu (de Hoffmann og Stroobant 2007, Thomas 2008). Nevrotransmitterne og nevrotransmitter-metabolittene er små molekyler og det er mange andre forbindelser som kan ha lik monoisotopisk masse. Kvadrupolens lave oppløsning kan derfor gi vanskeligheter med å skille andre forbindelser fra analyttene. Dette kan også bidra til økt bakgrunnsstøy i kromatogrammene. Ved bruk av to overganger økes selektiviteten og analyttene kan kvantifiseres med større sikkerhet. I denne oppgaven ble ikke ione-forholdstall undersøkt, men ved analyse av reelle prøver ble kromatogrammene av sekundærionet (overgang som ikke brukes til kvantifisering) også vurdert for å sikre at det var analyttene som ble kvantifisert.

### 3.1.3 Undersøkelse av en HILIC- metode

Ved HILIC øker retensjonen ved økende polaritet. Danaceau *et al.* har utviklet en HILIC LC-MS/MS metode for monoamine nevrotransmittere, og rapporterte at dette separasjonsprinsippet var et godt alternativ til RP (2012). For å undersøke om en HILIC-metode kunne utvikles for separasjon av nevrotransmitterne og metabolittene beskrevet i tabell 2 i kapittel 1.2 ble fem ulike HILIC- kolonner undersøkt (tabell 4 i kapittel 2.9). De to første kolonnene som ble undersøkt var av typen Acquity BEH Amide, hvor den ene kolonnen var 50 mm lang, og den andre 100 mm. Amid-kolonnene har ingen ioniserbare grupper på SP, men analytter retarderes via hydrofil fordeling i vannlaget på SP, hydrogenbindinger og elektrostatiske krefter. Det ble også forsøkt å bruke en Cortecs kolonne som har en SP av ren silika, og kan danne ioniske bindinger med positivt ladede analytter. Den fjerde og femte kolonnen som

ble undersøkt var en zwitterionisk SeQuant Zic-HILIC kolonne, som gir mulighet for ioniske bindinger med både positivt og negativt ladede analytter.

Acquity BEH Amide-kolonnen (50 mm) ga begrenset retensjon av de sure analyttene selv ved den minste andelen vandig buffer i mobilfasen som kunne tillates ved HILIC (5 %). En 100 mm lang BEH amide kolonne ble deretter undersøkt (figur 14). Isokratisk eluering med 15 % vandig mobilfase (figur A) ga brede topper for NE og DA og begrenset retensjon av syrene og da spesielt HVA også på 100 mm kolonnen. Isokratisk eluering med en høyere andel vandig mobilfase på 25 % (figur B) ga smalere topper for DA og NE, men lavere retensjonsfaktor for HVA, DOPAC og HVA enn ved 15 % vandig mobilfase. Gradienteluering ble undersøkt for å se om høyere retensjon av syrene og smale topper for DA og NE kunne oppnås (figur C). Syrene hadde begrenset retensjon, selv om andelen vandig mobilfase kun var 5 % fra 0-0,7 min inn i gradienten. Dette medførte at syrene eluerte i fronten og deres signal kunne risikere å bli undertrykt av upolare uretarderte forbindelser fra prøver. Grunnen til at syrene hadde en mindre retensjonsfaktor på denne kolonnen sammenlignet med aminosyrene og aminene er sannsynligvis at de er mindre polare.



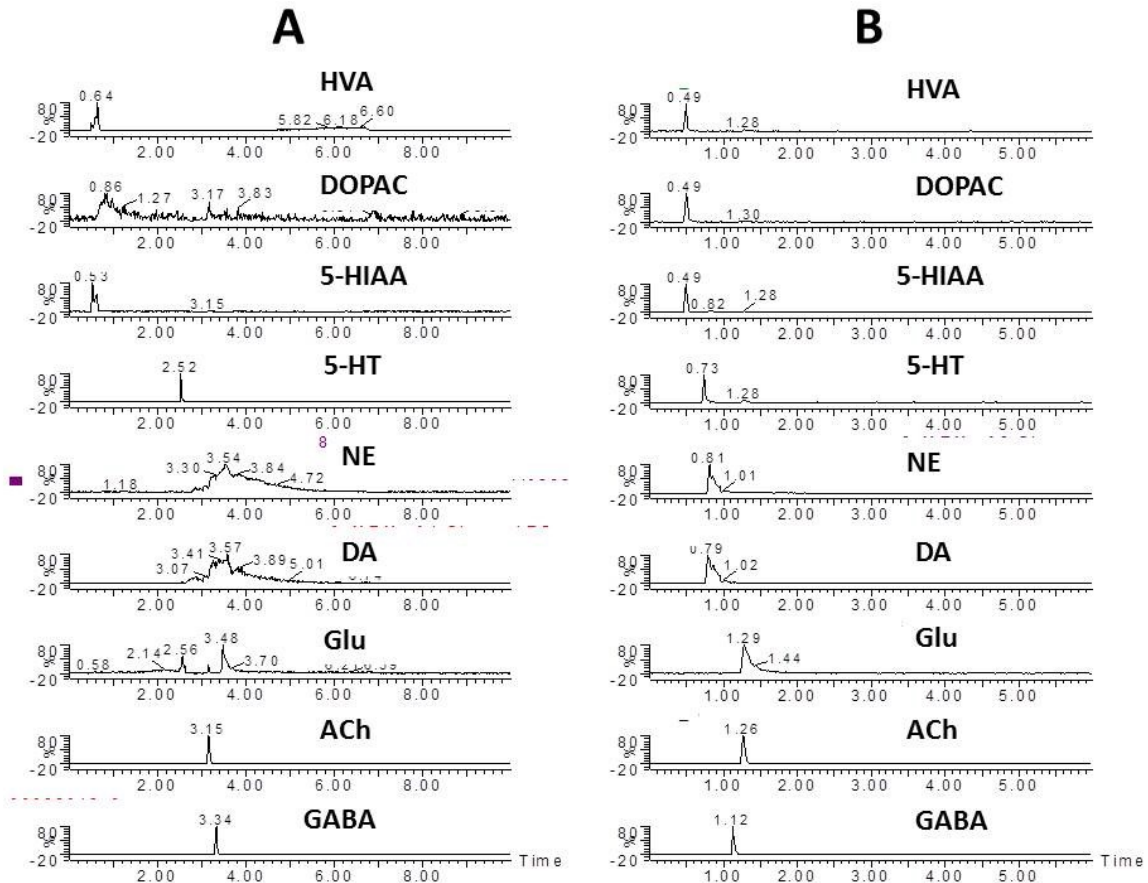
Figur 14: Total ionkromatogram (TIC) av 1 $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 25 mM ammoniumformat pH 3,1/ACN 5/95 separert på en BEH amid kolonne (2,1 mm i.d x 100 mm) med en mobilfase bestående av A: 50 mM ammoniumformat pH 3,1 og B: 50 mM ammoniumformat pH 3,1/ ACN 5/95. Mobilfasehastighet ved 0,5 mL/min, temperatur var 30 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. På figur A og B ble isokratisk eluering benyttet med andel A på hhv. 15 og 25 % og en analysetid på 3 min. På figur C ble gradienteluering med følgende gradientprofil benyttet: 0 % A ved start ble holdt isokratisk i 0,7 min, før en økning til 45 % B i løpet av 1,8 min, som ble holdt isokratisk i 0,5 min, før startkomposisjon ble gjenopprettet på 0,10 min. Reekvilibreringstid var 1,4 min.

Dette styrkes av at 5-HIAA, DOPAC og HVA har de høyeste log P verdiene av alle neurotransmitterne (tabell 2 kapittel 1.2) og ved kromatografering på en RP kolonne ved lav pH hadde syrene den største retensjonsfaktoren av alle analyttene. Som forventet hadde analyttene med lavest log P; Glu, GABA og NE sterkest retensjon på kolonnen. Aminene og aminosyrene er mer polare enn syrene og har derfor mer retensjon på kolonnen. Det ble kun observert en definert topp for NE ved isokratisk eluering og ikke ved gradienteluering. I Danaceau *et al*s (2012) metode for analyse av monoamine neurotransmittere ble en BEH amid kolonne brukt og monoaminene ble separert ved gradienteluering med en startkomposisjon på 85 % ACN og 15 % 30 mM ammoniumformat pH 3. Dette indikerer at mobilfasesammensetningen sannsynligvis bør bestå av en høyere andel vandig buffer

dersom gradienteluering brukes, og NE skal kunne separeres fra de andre analyttene. Dette er imidlertid ikke forenelig med start-sammensetningen som kreves for separasjon av de sure metabolittene i denne metoden.

Fordi det ikke var mulig å oppnå tilstrekkelig retensjon av de sure analyttene samtidig som NE ble separert fra de andre analyttene, ble kolonnene ikke brukt i videre metodeutvikling. Det ble utført flere forsøk hvor det ble undersøkt hvordan ulike faktorer påvirket separasjonen på amidkolonnen og disse er beskrevet i kapittel 6.1.1, 6.1.2 og 6.1.4 i appendiks.

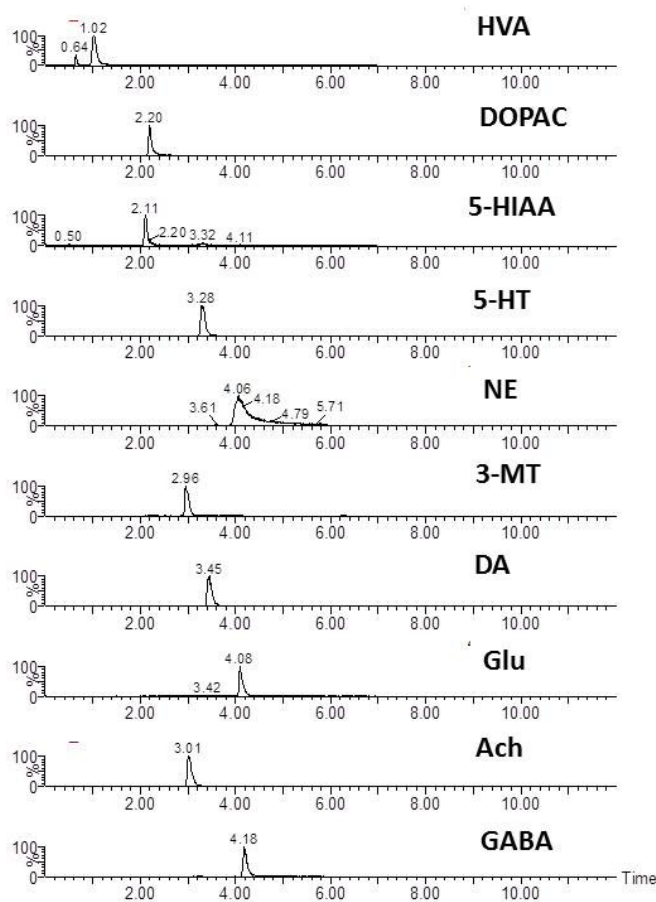
Waters Cortecs UPLC HILIC kolonne ga begrenset retensjon av syrene, samt svært sterk retensjon av DA og NE med en stor grad av haledannelse (figur 15). Haledannelsen skyldtes sannsynligvis den sterke bindingen mellom de positivt ladde amingruppene på DA og NE og den negative ladningen på silikaen, som vil være delvis ladet ved pH 3,1. Verken gradienter hvor andelen vandig buffer ble økt over svært korte tidsintervall, isokratisk eluering med opptil 33,5 % vandig buffer eller ionestyrke på 100 mM minsket haledannelsen betydelig. Standardene var løst i 10 mM ammoniumformat pH 3,1/50 mM ammoniumformat pH 3,1/ACN (10/5/95). Dersom prøvene hadde vært løst i en mindre andel vann kunne sannsynligvis retensjonsfaktor for syrene vært økt, men endringen ville nok ikke vært betydelig. Samtidig var graden av haledannelse på DA- og NE-toppene betraktelig selv ved svært høy ionestyrke. Å lage en separasjonsmetode hvor analyttene kunne skilles fra saltene i mikrodialyseprøvene, samtidig som høy effektivitet ble oppnådd var ikke mulig og Cortecs kolonnen ble av nevnte grunner ikke benyttet videre. Det ble utført et forsøk hvor ulike løsningsmidler for analyttene ble undersøkt med kolonnen. Forsøket er beskrevet i kapittel 6.1.3 i appendiks.



Figur 15: TIC av ca. 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 10 mM ammoniumformat pH 3,1/50 mM ammoniumformat pH 3,1/ACN 10/5/95, separert på en HILIC Cortecs kolonne med en mobilfase bestående av A: 50 mM ammoniumformat pH 3,1 og B: 10 mM ammoniumformat pH 3,1/ ACN 5/95. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. På figur A ble en gradientprofil som følgende benyttet: 0 % A ved start holdt isokratisk i 0,7 min, før en økning til 47 % A i løpet av 4,3 min, som deretter ble holdt isokratisk i 1,0 min før start-sammensetning ble gjenopprettet på 0,1 min. Reekvilibreringstid var 3,9 min. På figur B ble isokratisk eluering benyttet, med 20 % A og en analysetid på 5 min.

SeQuant Zic-HILIC-kolonnen var den av kolonnene som ga høyest retensjonsfaktor for alle analytter, samt normalfordelte topper med begrenset haledannelse, med unntak av NE (figur 16). Zic-HILIC-kolonnene har en zwitterionisk stasjonærfase og kan således danne ioniske bindinger med både positivt og negativt ladde analytter. Dette gjør at alle neurotransmitterne kan ha interaksjon med SP i større grad og få mer retensjon.

Ved bruk av en Zic-HILIC kolonne vil det i større grad kunne vært mulig å separere analyttene fra saltene i mikrodialyseprøvene enn med noen av de andre HILIC-kolonnene som ble undersøkt. Ettersom alle neurotransmitterne har retensjon er det spillerom til å påvirke separasjonen ved å variere mobilfasesammensetning, temperatur og ionestyrke, slik at de kan skilles fra saltene. Zic-HILIC var kolonnen som ga best resultat mht. retensjonsfaktor og effektivitet og ville blitt valgt og brukt i videre utvikling hvis mulig.



Figur 16: TIC av 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 10/90 10 mM ammoniumformat/ACN separert på en SeQuant Zic-HILIC (3 $\mu$ m, 100mm x 2,1 mm) med en mobilfase bestående av A: 25 mM ammoniumformat pH 4, og B: ACN. Temperatur var 45 °C, mobilfasehastighet var 0,5 mL/min og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen var som følgende: 5 % A ved start holdt i 0,5 min, før en økning til 12 % A i løpet av 0,7 min, økning til 25 % A i løpet av 1,0 min, økning til 32 % A i løpet av 0,8 min, økning til 40 % A i løpet av 0,8 min, økning til 45 % A i løpet av 0,7 min, og til slutt en økning til 50 % A i løpet av 0,2 min, som deretter ble holdt isokratisk i 1,0 min før start sammensetning ble gjenopprettet på 0,01 min. Reekvilibreringstid var 3 min.

Zic-HILIC ble undersøkt relativt sent i forløpet til denne masteroppgaven og tidsressursene som trengtes for optimalisering av metoden fulgt av validering var ikke tilgjengelige. Laboratoriet hvor metodeutviklingen ble utført er også et rutinelaboratorium, hvor store prøvevolumer analyseres ved RP-LC-MS hver dag. Av hensyn til øvrig og prioritert aktivitet i laboratoriet kan HILIC bli utfordrende, da mobilfase, vaskeløsninger og kolonner som brukes ved HILIC har motsatt løsemiddelstyrke og polaritet sammenlignet med løsningene og kolonnene som brukes ved RP. Dette medfører at alle løsninger og kolonne må byttes ved bytte av oppsett mellom RP og HILIC. HILIC viste seg også å være ustabil, og krever lengre reekvilibreringstider enn RP. De lengre reekvilibreringstidene kan også være en ulempe dersom et større antall prøver skal analyseres. RP er stabilt, robust og klart til bruk på alle

instrumentene på laboratoriet. Det ble av nevnte grunner besluttet at videre metodeutvikling skulle gjøres på et RP-system.

### **3.1.4 Utvikling av en RP-metode**

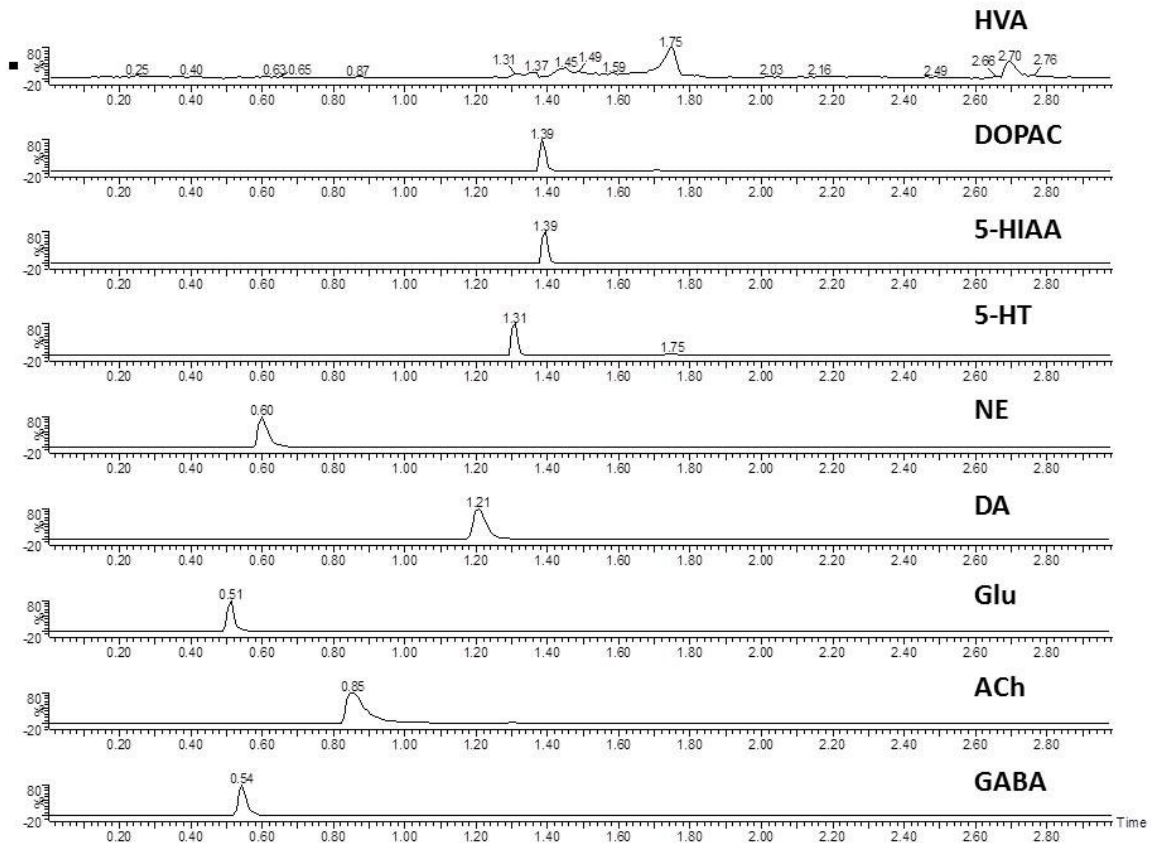
#### ***3.1.4.1 Stasjonær fase***

Flere av neurotransmitterne metoden skulle utvikles for forekommer ved svært lave konsentrasjoner i mikrodialysat, samtidig som mikrodialysat inneholder salter. Som gitt i tabell 2 i kapittel 1.2 er neurotransmitterne og neurotransmittermetabolittene hydrofile polare forbindelser. Dette medfører at de vil ha begrenset retensjon på en RP-kolonne. En RP kolonne som gir størst mulig retensjon av polare analytter, slik at de kan skilles fra de uorganiske saltene som finnes i mikrodialysat og unngå ioneundertrykking, var derfor nødvendig. Samtidig var det også en fordel at analyseløstiden er kort, siden et stort antall prøver ofte skal analyseres.

Tre ulike RP kolonner ble undersøkt under utviklingen (spesifikasjoner er gitt i tabell 4 i kapittel 2.9): En HSS T3 C<sub>18</sub>-kolonne, en BEH C<sub>18</sub>-kolonne og en BEH fenyl-kolonne.

Først ble HSS T3-kolonnen med et anbefalt pH-område mellom 2 og 8 undersøkt (figur 17). GABA, Glu og NE hadde lav retensjonsfaktor ved separasjon innenfor det anbefalte pH-området på HSS T3-kolonnen. Den lave retensjonsfaktoren ville kunne medføre at analyttene ble påvirket av matrikseffekter fra salter i Ringers løsning.

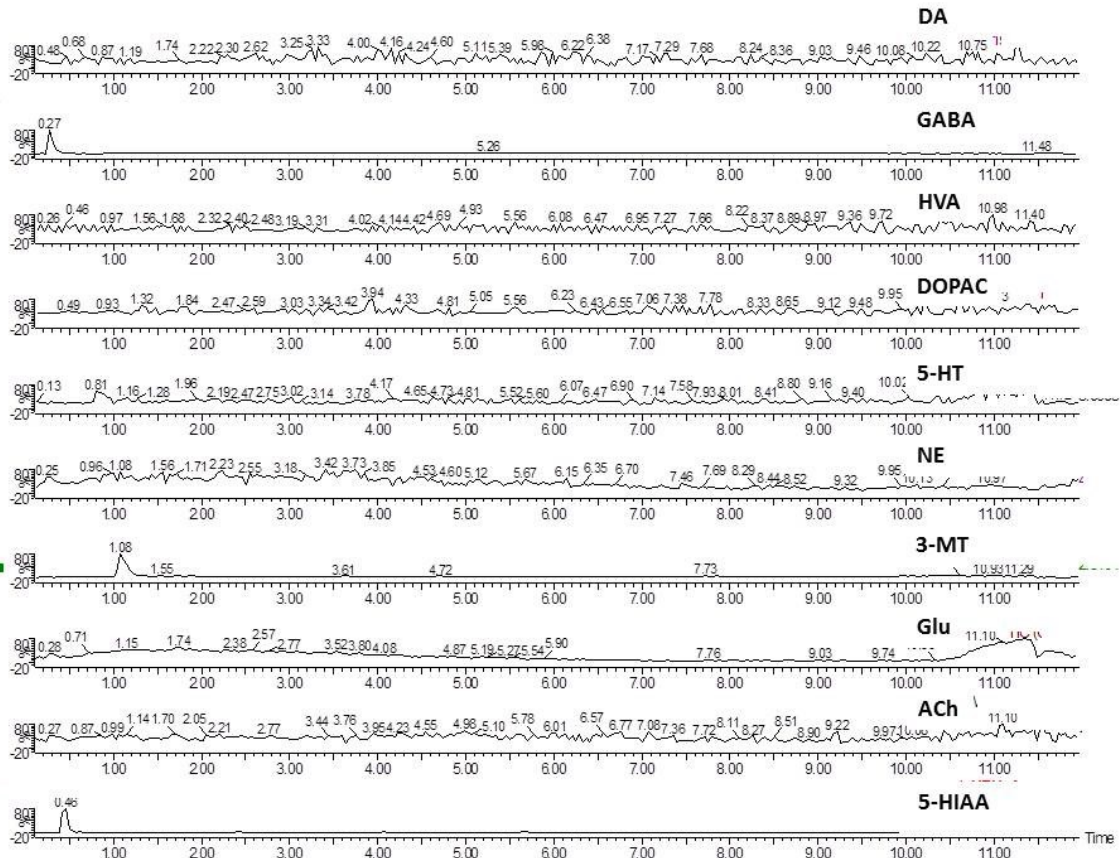
For å undersøke separasjon ved høy pH ble BEH C<sub>18</sub>-kolonnen brukt. Kromatografering av analyttene løst i løsningsmiddel ved høy pH, separert med en mobilfase med høy pH på Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> ga kromatogrammer som vist i figur 18. Som figuren viser kunne ikke de fleste av analyttene sees som definerte topper eller var preget av mye støy. Aminene har pK<sub>a</sub>-verdier rundt 8-9, og vil ha en begrenset grad av ionisering ved høy pH, noe som kan føre til lavere MS-signal. Det er også kjent at katekolaminer som DA og NE er ustabile ved høy pH og forbindelsene kan ha degradert i det basiske løsningsmiddelet eller mobilfasen som ble brukt. Løsningene var heller ikke nylaget, noe som kan ha ført til ytterligere degradering.



**Figur 17:** TIC av 1  $\mu\text{M}$  neurotransmittere og metabolitter i 10 mM ammoniumformat pH 3,1, separert på en HSS T3 C18 kolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 10 mM ammoniumformat pH 3,1 og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu\text{L}$ . Gradientprofilen som ble benyttet var følgende: 0 % B ved start som ble holdt isokratisk i 0,5 min, deretter økt til 100 % i løpet av 0,5 min. 100 % B ble deretter holdt i 1 min, før opprinnelig sammensetning ble gjenopprettet iløpet av 0,10 min. Reekvilibreringstid var 0,9 min.

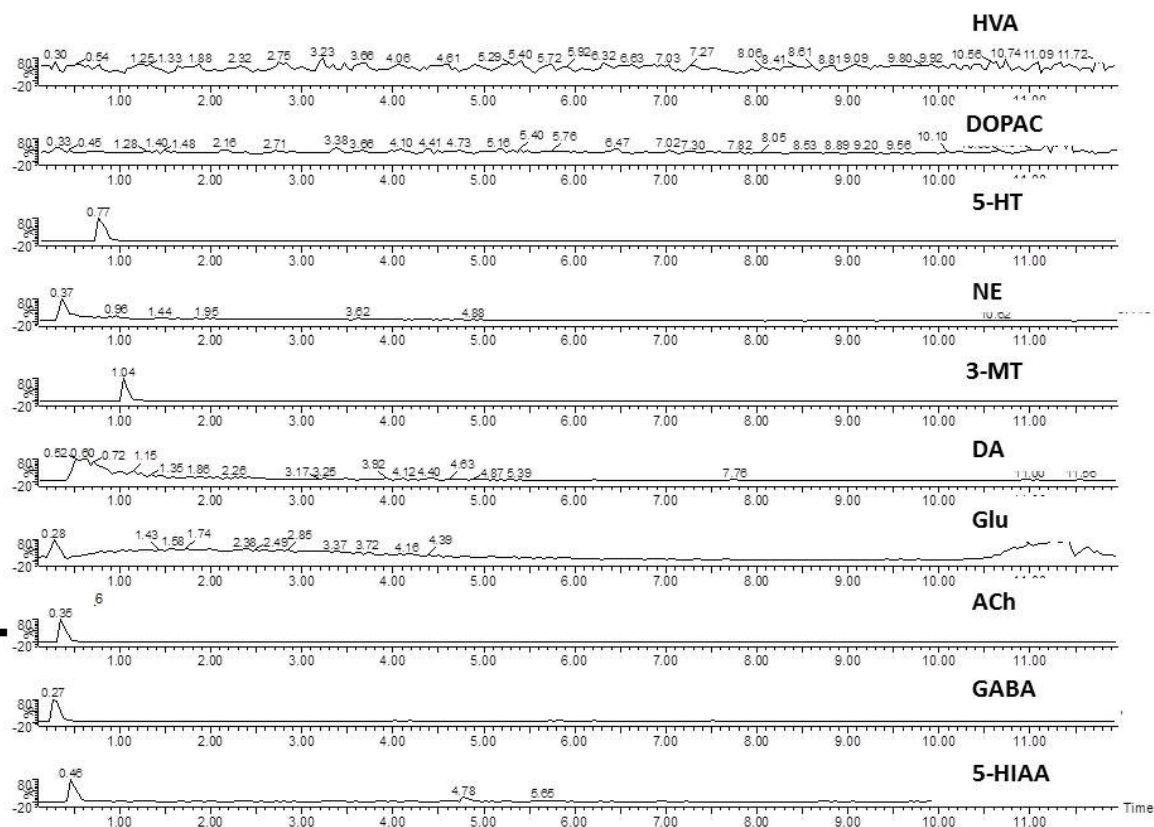
Fordi løsningene ikke var nylaget er det vanskelig å trekke en konklusjon fra dette forsøket, men analyttene separert på BEH C<sub>18</sub>-kolonnen som vist som definerte topper hadde en lavere retensjonsfaktor enn på HSS T3-kolonnen. Grunnet den lave retensjonsfaktoren ble ikke separasjon på BEH-kolonnen ved lav pH brukt videre i metodeutviklingen.





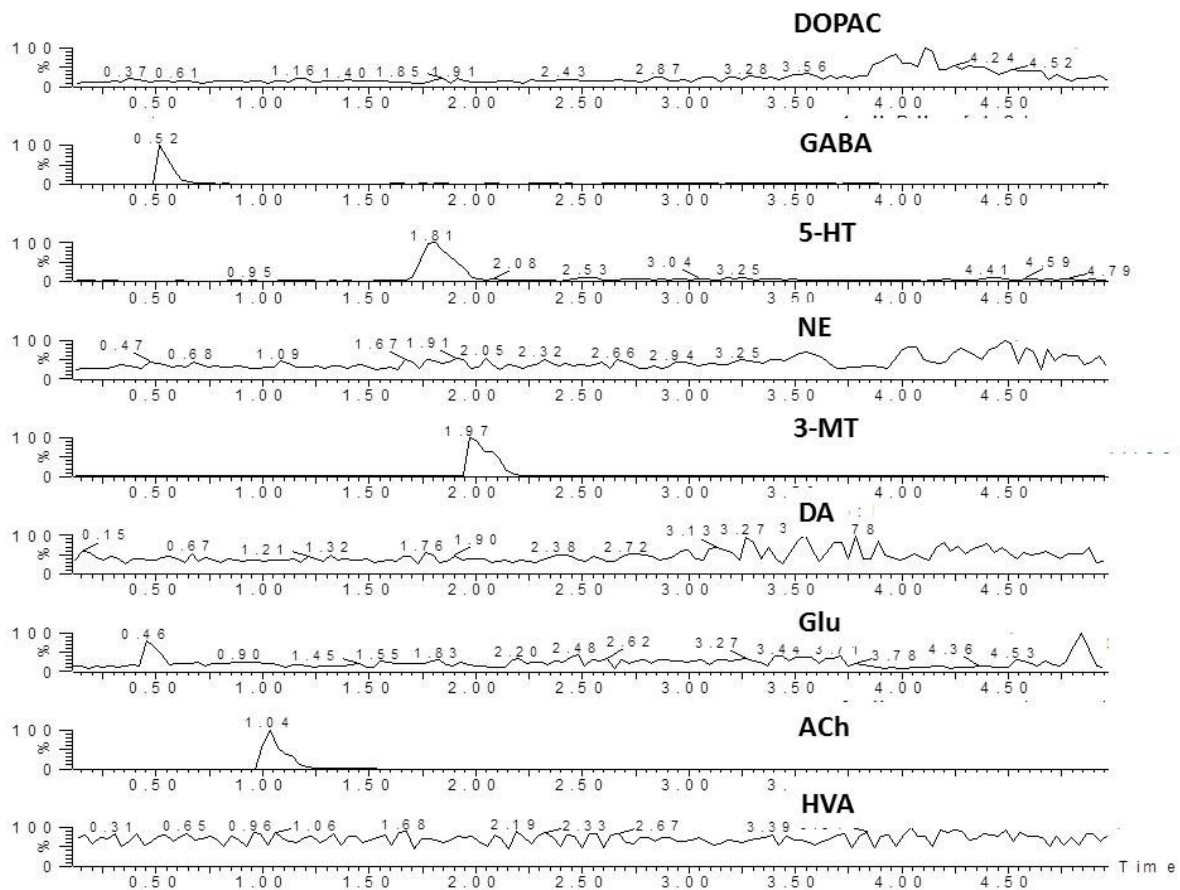
Figur 18: TIC av 1 µM neurotransmittere og metabolitter i 5 mM ammoniumbikarbonat pH 8,5 separert på en BEH C<sub>18</sub> kolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 5 mM ammoniumbikarbonat pH 8,5 og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5 µL. Gradientprofilen var som følgende: 2,5 % B ved start, deretter en økning til 100 % B i løpet av 10 min, 100 % B ble holdt i ett minutt, før start sammensetning på 2,5 % B ble gjenopprettet i løpet av 0,1 min. Reekvilibreringstid var 0,9 min.

BEH C<sub>18</sub> har en annen kjemisk binding av C<sub>18</sub>-kjedene til bærematerialet enn HSS T3, samt ulik partikkelstørrelse og overflateareal. Dette ville kunne påvirke retensjonen og separasjonen av analyttene. For å undersøke om retensjonsfaktoren økte relativt til HSS T3 ble separasjon på BEH C<sub>18</sub> ved høy pH også utført (figur 19). Kromatogrammene viste at forbindelsene fikk lavere retensjonsfaktor på BEH C<sub>18</sub> sammenlignet med HSS T3.

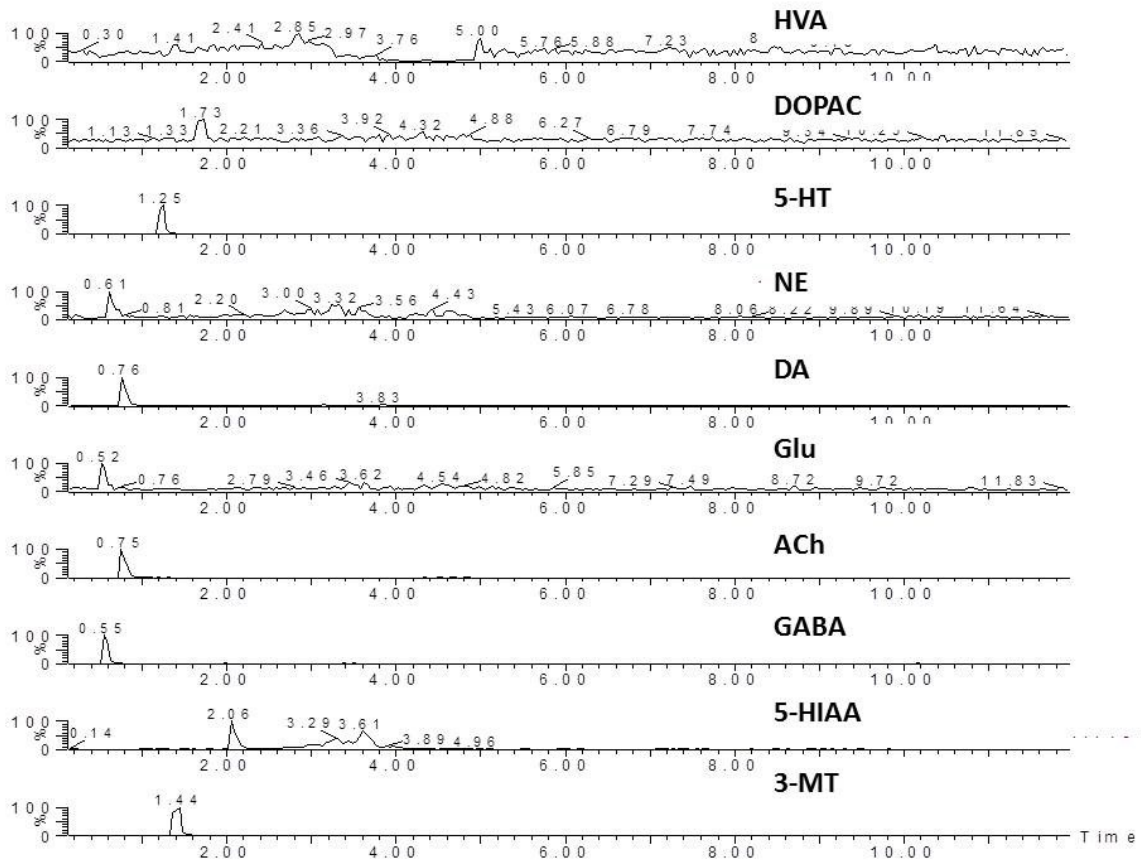


Figur 19: TIC av 1 $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 25 mM FA separert på en BEH C18 kolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 10 mM ammoniumformat pH 3,1 og B:MeOH. Mobilfasefastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen var tilsvarende som beskrevet i figurtekst 18.

For å undersøke om en kolonne med mulighet for  $\pi$ - $\pi$  interaksjoner kunne gi økt retensjon av analyttene med aromatisk struktur (5-HT, 5-HIAA, NE, DA, 3-MT, DOPAC og HVA) ble BEH fenykolonnen undersøkt. Separasjoner på fenykolonnen ble utført med både lav og høy pH (figur 20 og 21). Ved høy pH var kromatografien tilsvarende som ved bruk av BEH-kolonnen med udefinerte topper og mye støy. Neurotransmitterne som ga tydelige kromatografiske topper hadde også lav retensjonsfaktor. Ved separasjon på fenykolonnen ved lav pH kan det observeres flere tydelige topper, og mindre støy i kromatogrammene. Retensjonsfaktoren for GABA, Glu og NE, samt flere av de andre forbindelsene var derimot ikke høyere sammenlignet med HSS T3-kolonnen. Fenykolonnen ble derfor ikke brukt videre.



Figur 20: SRM-kromatogram av 1  $\mu\text{M}$  neurotransmittere og metabolitter i 5 mM ammoniumbikarbonat pH 8,5, separert på en BEH fenylkolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 5 mM ammoniumbikarbonat pH 8,5 og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 C° og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu\text{L}$ . Gradientprofilen var som følgende: 2,5 % B ved start som ble holdt isokratisk i 0,5 min, deretter økt til 10 % i løpet av 0,7 min, deretter en økning til 20% i løpet av 0,3 minutter, så en økning til 25% i løpet av 0,4 minutter, videre økning til 60% i løpet av 0,9 min, deretter økning til 80% på 0,4 minutter, og til slutt en økning til 100% i løpet av 0,05 min. 100 % B ble så holdt isokratisk i 1 min, før opprinnelig sammensetning på 2,5 % B ble gjenopprettet i løpet av 0,01 min. Reekvilibreringstid var 1,24 min. Kromatogram av 5-HIAA er ikke i figuren fordi overgangen til stoffet ikke var lagt inn i MS-metoden under forsøket.



Figur 21: TIC av 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 10 mM ammoniumformat pH 3,1, separert på en BEH fenylkolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 10 mM ammoniumformat og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min og temperatur var 65 °. Gradientprofilen var som følgende: 0,5 % B ved start som ble holdt isokratisk i 0,5 min, deretter økt til 10 % i løpet av 0,7 min, deretter en økning til 20 % i løpet av 0,3 minutter, så en økning til 25 % i løpet av 0,4 minutter, videre økning til 60 % i løpet av 0,9 min, deretter økning til 80 % på 0,4 minutter, og til slutt en økning til 100 % i løpet av 0,05 min. 100 % B ble så holdt isokratisk i 1 min, før opprinnelig sammensetning på 0 % B ble gjenopprettet i løpet av 0,01 min. Reekvilibreringstid var 1,24 min.

Konklusjonen var at separasjoner ved lav pH ga best separasjon, høyest retensjonsfaktor og best stabilitet av analyttene. Ved analyse med lav pH i mobilfasen ga Waters Acquity UPLC HSS T3-kolonnen best separasjon og høyest retensjonsfaktor (figur 17), sammenlignet med Waters Acquity BEH Fenyl og Waters Acquity BEH C<sub>18</sub>. Kolonnen kan også brukes ved 100 % vandig buffer i motsetning til fenyl-kolonnen og BEH C<sub>18</sub>-kolonnen. GABA, Glu og NE hadde begrenset separasjon på alle kolonnene. HSS T3-kolonnen ble derfor brukt i videre metodeutvikling. Fordi separasjoner ved høy pH ga udefinerte topper og mye støy i kromatogrammene ble ikke basisk mobilfase brukt i videre metodeutvikling. Analyttene ble også deretter løst i enten 25 mM FA eller 10 mM ammoniumformat pH 3,1 for å øke stabiliteten.

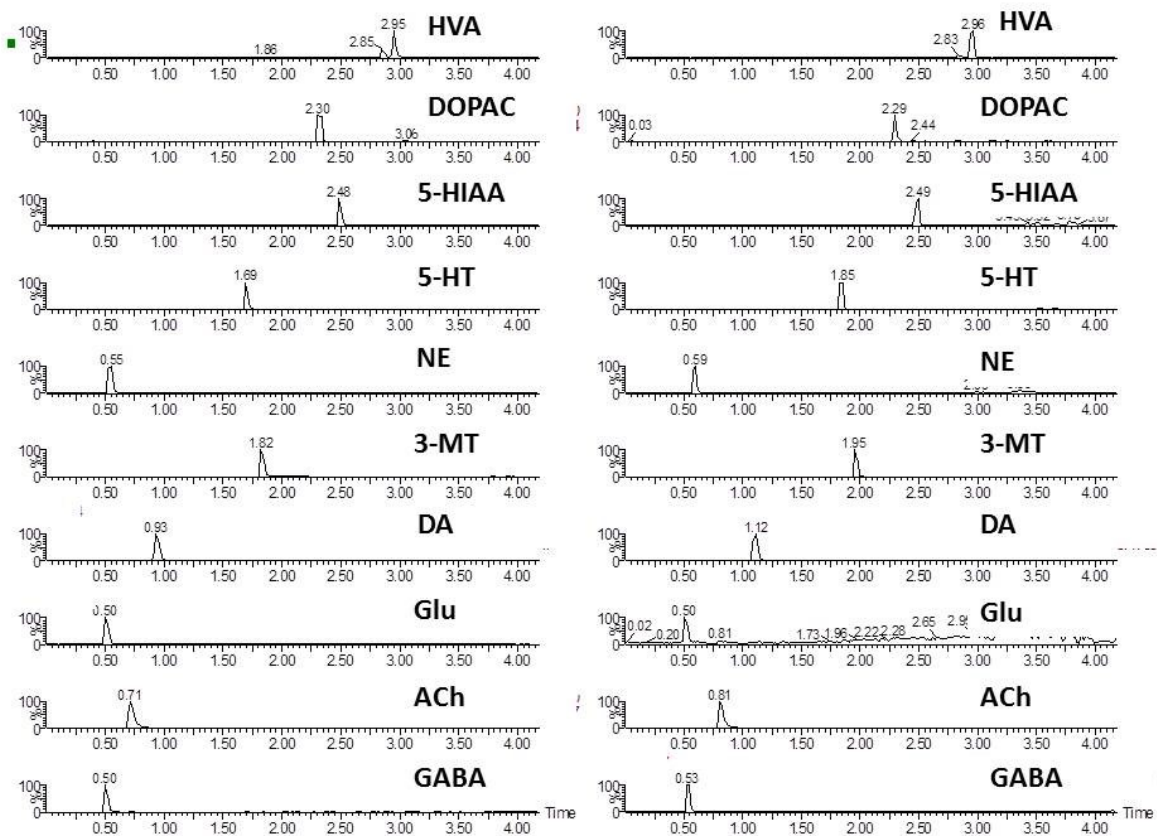
### **3.1.4.2 Mobilfase**

Basert på resultatene beskrevet i kap. 3.1.4.1 ble lav pH valgt for videre utvikling av metoden. For å undersøke om retensjonen av stoffene kunne økes, samt finne en mobilfase med et minimum av ioneundertrykking, ble sammensetninger av vandig mobilfase (MP A) undersøkt, deriblant ammoniumformat pH 3,1, ammoniumacetat pH 5 og 25 mM FA. Ammoniumacetat ble raskt forkastet ettersom den ga mindre retensjonsfaktor enn ammoniumformat for Glu, selv ved 100 % vandig buffer ved start av gradient.

En blanding av neurotransmitterne (1  $\mu$ M) ble tillaget i buffer tilsvarende mobilfasen som skulle undersøkes (ammoniumformat eller 25 mM FA) og analysert ved samme gradient (fig 22). En liten økning i retensjonsfaktor for enkelte stoffer kunne observeres, men forskjellen var svært liten for Glu og GABA. Ammoniumformat ga signaltap for 5-HIAA og Glu. Derfor ble 25 mM FA valgt for videre metodeutvikling.

For å undersøke om en aprotisk organisk modifikator kunne påvirke separasjonsselektiviteten og retensjonen ble ACN undersøkt som mobilfase B. Kromatogrammene viste ingen endring sammenlignet med bruk av metanol. Metanol ble grunnet dette, og lavere pris i forhold til acetonitril benyttet i metoden.

Kort oppsummert ble det funnet at en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B:MeOH ga best signalintensitet og høyest retensjonsfaktor. Denne mobilfasen ble derfor benyttet i videre metodeutvikling.

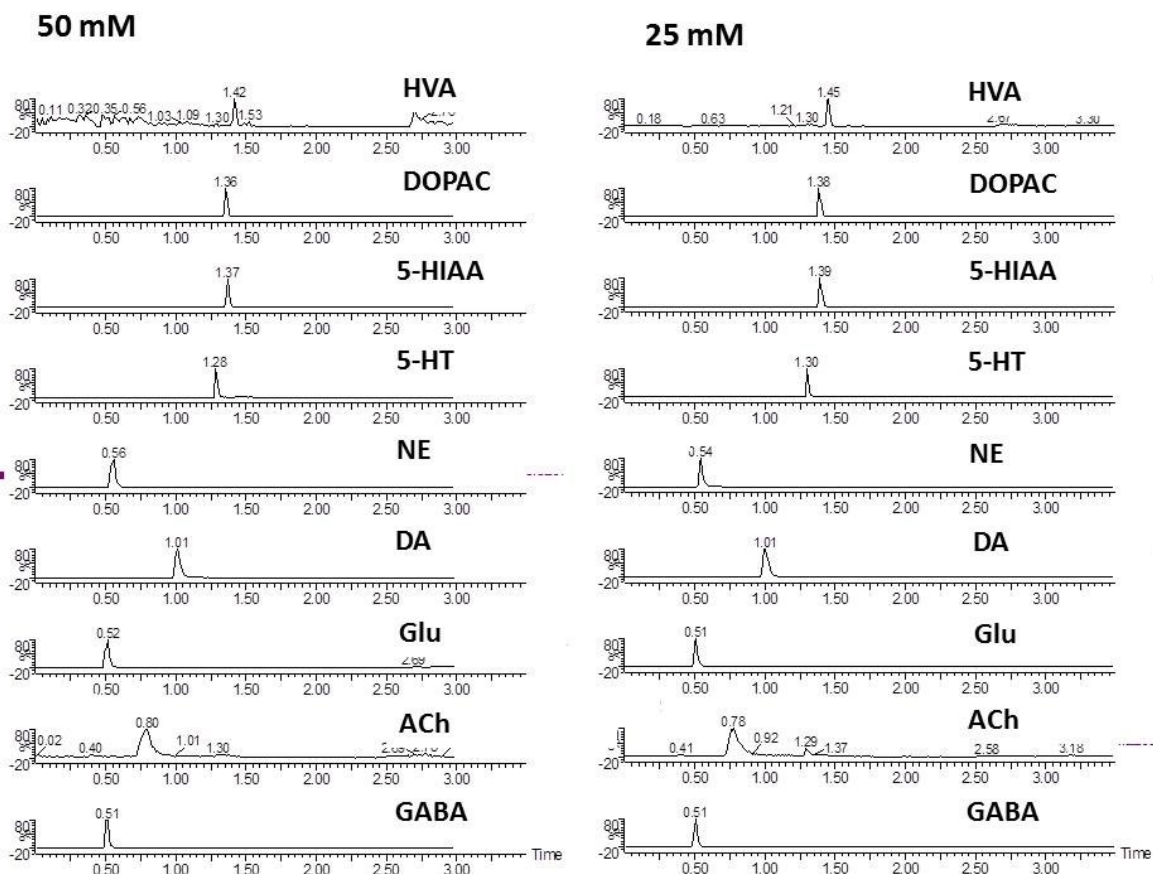


Figur 22: SRM-kromatogram av 1  $\mu$ M nevrotransmittere og metabolitter i 25 mM FA (venstre) og 10 mM ammoniumformat (høyre) separert på en HSS T3 kolonne med mobilfaser bestående av A: 25 mM FA (venstre) og A: 10 mM ammoniumformat pH 3,1 (høyre) og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen var som beskrevet i figurtekst 21.

### 3.1.4.3 Ionestyrke

Ulike ionestyrker (12,5; 25; 37,5; 50; 125 og 250 mM) av FA ble undersøkt for å finne hvilken innvirkning dette hadde på retensjonsfaktor og signalstyrke. Kromatogrammer ved en ionestyrke på 25 mM FA og 50 mM FA er gitt i figur 23. Det ble funnet at ionestyrker over 25 mM ga en økning i retensjonsfaktor for ACh, DA, og NE, men førte til signaltap for syrene (5-HIAA, DOPAC og HVA). Signaltapet til syrene skyldes sannsynligvis at pH minker ved økt syrekonsentrasjon. Syrene har pKa-verdier fra 3,6-4,2, og pH i 25 mM FA ble målt med pH-meter til en verdi på 2,6. Dette kan bidra til et lavere MS-signal. Ved ionestyrke lavere enn 25 mM ble det ikke observert signifikant signaltap eller endring i retensjonsfaktor. På grunnlag av dette ble det besluttet å benytte 25 mM FA i metoden.





Figur 23: TIC av  $1\mu\text{M}$  neurotransmittere og metabolitter løst i 25 mM FA separert på en HSS T3 kolonne med mobilfase bestående av A: 25 mM FA (høyre) og A: 0,2 % FA (venstre) og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  og injeksjonsvolum var  $7,5\ \mu\text{L}$ . Gradientprofilen var tilsvarende som beskrevet i figurtekst 17.

### 3.1.4.4 Løsningsmiddel for prøver

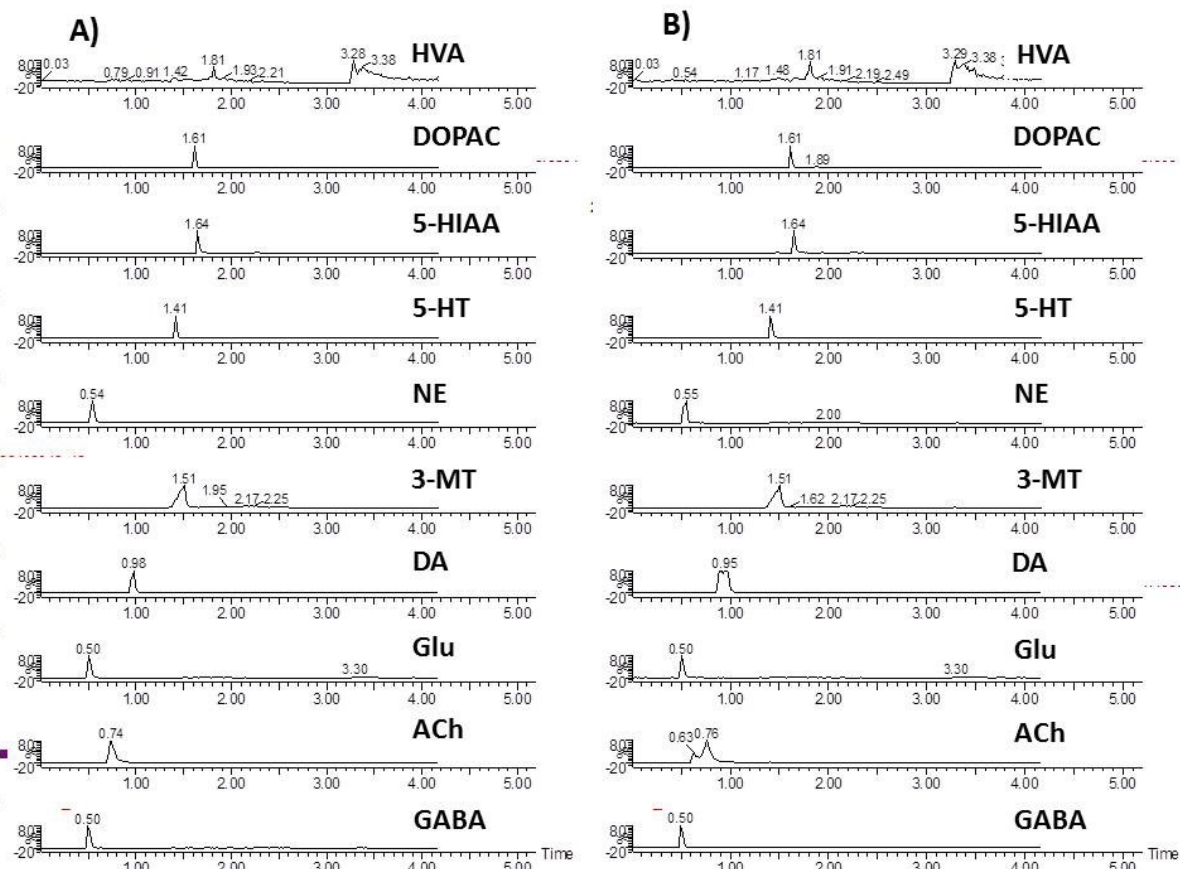
Hvilket løsningsmiddel analytten er løst i kan ha stor effekt på retensjonsfaktor og toppform. Analytten må være løselig og stabil i pH i løsningen slik at den ikke degraderes, og løsningsmidlet bør ikke ha en løsningsmiddelstyrke større enn mobilfasen som benyttes. Dersom styrken i løsningsmiddelet er høyere vil retensjonen av analytt i starten av kolonnen kunne påvirkes og virke negativt inn på toppformen. Det mest optimale er derfor å benytte et løsningsmiddel som er så likt mobilfasen som mulig, slik at det ikke påvirker separasjonen av analyttene (Moldoveanu og David 2013b).

Løsninger av neurotransmittere i 25 mM FA, ammoniumformat pH 3, ammoniumformat pH 4, ammoniumacetat pH 5 og ammoniumbikarbonat pH 8,5 ble analysert for å undersøke om pH i løsningsmidlet hadde innvirkning på analyttenes kromatografi. Det ble ikke funnet at pH i

løsning påvirket separasjonen i større grad ved det injeksjonsvolumet som ble benyttet (7,5  $\mu$ L).

For å undersøke hvor mye MeOH som kunne tilsettes prøver før toppform og retensjon ble påvirket, ble løsninger med neurotransmitter i 25 mM FA tilsatt økende mengder metanol. Toppsplitting ble observert allerede ved 9 % metanol (laveste tilsetning undersøkt), se figur 24. Ved tilsetning av større andeler MeOH oppsto kraftig fronting, og ytterligere toppsplitting. Det ble da antatt at prøvene ikke kunne tilsettes MeOH. Ettersom gradienten består av 99,5 % FA ved start, er det logisk at en prøve med høyere løsningsmiddelstyrke vil ha en negativ påvirkning på kromatografien. Det kan observeres mye støy i HVA-kromatogrammet. Ved bestemmelse av og optimalisering av MS-overganger ble det funnet at HVA ga lavere signal enn de andre forbindelsene selv ved høye konsentrasjoner. Det er derfor mulig at konsentrasjonen brukt i forsøket (1  $\mu$ M) var nær MDK hvor signalet ofte er varierende og støy lett påvirker signalet. Ettersom pH i løsningsmiddelet var av liten betydning ble standarder/kalibratorer/kontroller videre løst i 25 mM FA ettersom dette ble brukt i mobilfasen.

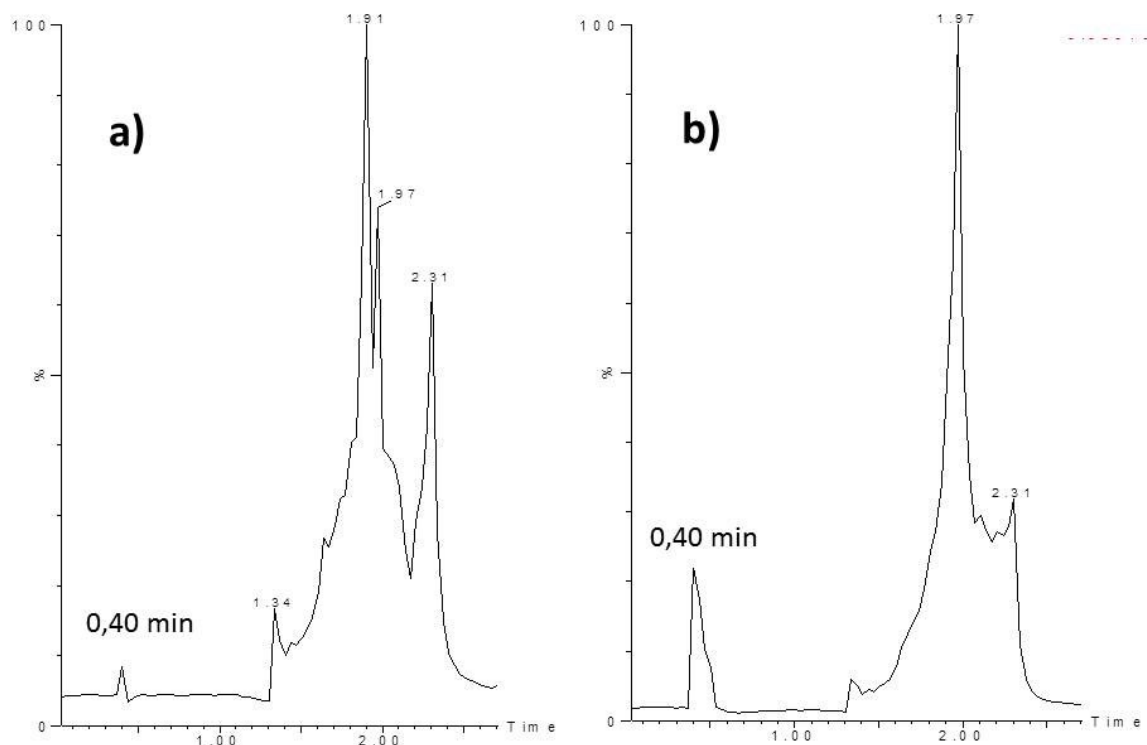




Figur 24: TIC av 1  $\mu$ M neurotransmitterne og metabolitter i 25 mM FA (A) og i 9 % MeOH i 25 mM FA (B), separert på en T3 kolonne med en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen var som følgende: 0 % B ved start som ble holdt isokratisk i 0,5 min, deretter en økning til 40 % B i løpet av 0,5 min, fulgt av en økning til 80 % B i løpet av 0,6 min, før andelen B ble økt til 100 % og holdt isokratisk i 1,0 min før startsammensetningen på 0 % B ble gjenopprettet i løpet av 0,01 min. Reekvilibreringstid var 1,04 min

### 3.1.4.5 Bestemmelse av nullretensjonstid

For å anslå nullretensjonstiden ble analyser av ren mobilfase og Ringers løsning utført (figur 25). Ringers løsning inneholder flere salter som sannsynligvis ikke vil ha retensjon på et RP system. Forsøket ble utført for å anslå hva nullretensjonstiden er, samtidig som det kunne finnes om noen av neurotransmitterne eluerte samtidig som saltene.



**Figur 25:** Full scan kromatogram av ren mobilfase (a) og Ringers løsning (b) separert på en HSS T3 kolonne, med en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH. Temperatur var 65 °C, mobilfasehastighet var 0,5 mL/min og injeksjonsvolum var 7,5 µL. Gradientprofilen var som følgende: 0 % B ved start holdt isokratisk i 0,5 min, deretter en økning til 100 % B i løpet av 0,7 min som ble holdt isokratisk i 1,0 min før startsammensetning på 0 % B ble gjenopprettet på 0,01 min. Regenereringstid var 1,0 min.

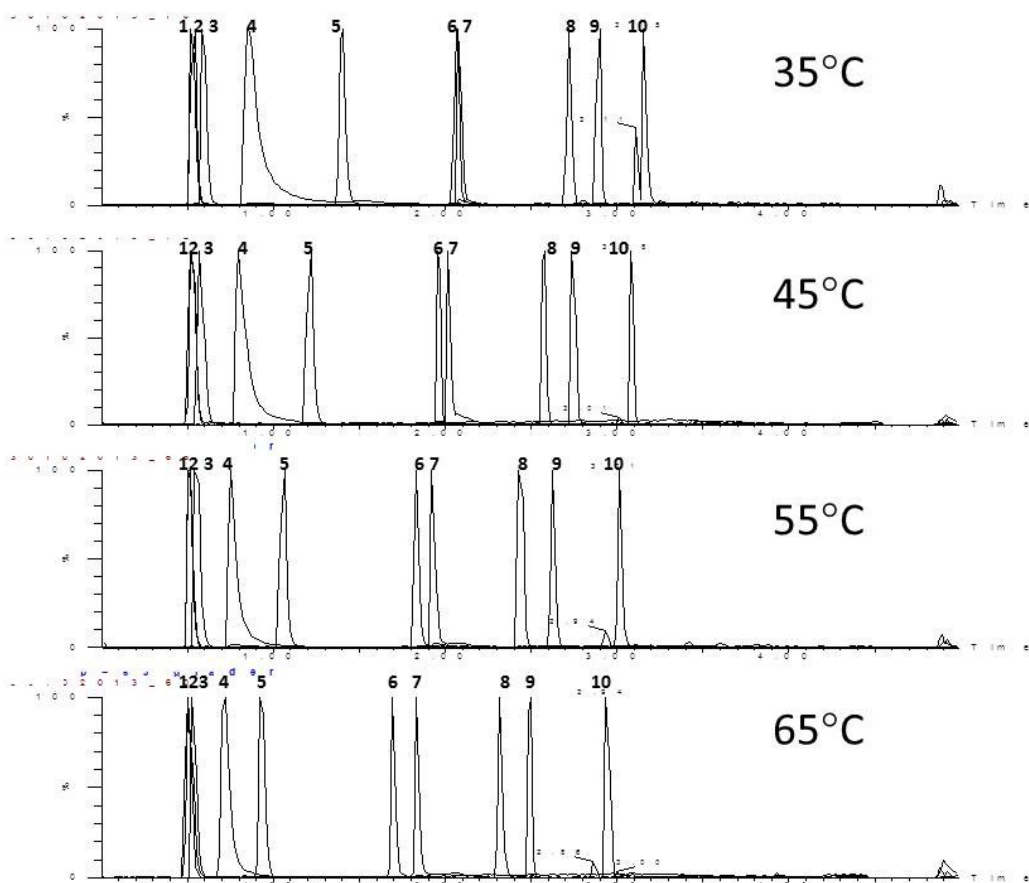
Fronten kan observeres ved 0,4 min ved både injeksjon av ren mobilfase og Ringers løsning. Kromatogrammet av Ringers løsning viser at toppen i front er større enn i ren mobilfase. Ionene som observeres stammet fra Ringers løsning og eventuelt forurensninger fra mobilfase og kolonne. Det kunne da fastslås at nullretensjonstiden til kolonnen var 0,4 minutter. Figur 25 viser at salttoppen fra injisert Ringers løsning var bred. Det var da stor sannsynlighet for at neurotransmitterne som eluerte tidlig, GABA, Glu og NE (figur 17), ville bli påvirket og få signaltap grunnet ioneundertrykking.

En teoretisk nullretensjonstid ble beregnet ved bruk av ligning 1 gitt i kapittel 1.4.3. Det ble antatt en porøsitet på 0,6 som ga en  $t_{M} = 0,4156$  min for HSS T3-kolonnen med 2,1 mm i.d og lengde på 100 mm. Teoretisk nullretensjonstid og målt nullretensjonstid samsvarte derfor veldig godt.

Det ble observert store sammenfallende topper i begge kromatogrammene i figur 25. Slike topper kalles ofte spøkelsestopper og kan forekomme av mange ulike årsaker. Disse toppene kan blant annet stamme fra forurensninger i mobilfase som fokuseres på kolonnen og frigjøres når gradienten økes til høy nok løsemiddelstyrke (Williams 2004). Det ble mistenkt at spøkelsestoppene kom av urenheter i type 1-vann eller FA brukt i mobilfasen. Mobilfase A (25 mM FA) ble tillaget i hhv. LC-MS flaskevann og type-1 vann fra to ulike MQ apparat. De tillagede mobilfasene ble deretter injisert på kolonnen samtidig som de ble brukt som mobilfase A, for å undersøke om det var urenheter i vannet som ga spøkelsestoppene. Analyse av type-1 vann med type-1 vann som mobilfase A ble også gjort, for å finne om det var maursyren som var opphav til toppene. Den store toppen ble observert ved alle analyser og stammet da ikke fra vann eller maursyre. Det er mulig at toppene kan ha kommet fra urenheter i den organiske modifikatoren brukt i mobilfasen, men dette ble ikke undersøkt. Slike topper kan også komme av blødning fra kolonnen og overdrag (Williams 2004). Fordi en rekke ulike biologiske matrikser analyseres ved FHI er det også en sannsynlighet for at urenheter fra prøver kan ha satt seg et sted i analysesystemet og frigjøres ved tilstrekkelig løsemiddelstyrke. Spøkelsestopper blir ofte observert ved FHI selv ved injeksjon av blanke prøver.

#### ***3.1.4.6 Temperatureffekt***

Retensjonsfaktoren til en analytt kan endres ved å endre mobilfase, stasjonærfase eller temperatur. For å undersøke om temperatur hadde en effekt på retensjonsfaktor og separasjon ble en løsning (1  $\mu$ M) av analyttene analysert ved 35 °C, 45 °C, 55 °C og 65 °C. Kromatogram av stoffene ved de ulike temperaturene er vist i figur 26. Grunnen til at høyere temperaturer ikke ble undersøkt var at anbefalt maksimumstemperatur for kolonnen allerede var overskredet ved 65 °C. Maksimumstemperatur anbefalt av produsent var på 45 °C, men lang tids praktisk erfaring har vist at kolonnen tåler denne temperaturen. Separasjoner ved 65 °C utføres i flere metoder ved FHI.



Figur 26: TIC av 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 25 mM FA separert på en HSS T3 kolonne med en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH ved ulike temperaturer. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen var lik som beskrevet i figurtekst 21. Elueringsrekkefølgen var som følgende; Glu (1), GABA (2), NE (3), ACh (4), DA (5), 5-HT (6), 3-MT (7), DOPAC (8), 5-HIAA (9) og HVA (10).

Toppene blir smalere og retensjonstiden kortere ved økende temperatur. En smalere topp kan spesielt observeres for ACh hvor haledannelsen minker ettersom temperaturen øker. Figuren gir også at selektiviteten for 3-MT og 5-HT øker med temperaturen, samtidig som selektiviteten for Glu, GABA og NE minker. Temperaturøkningen fører til at viskositeten til mobilfasen minker, som gir mindre mottrykk. Høyere temperatur øker diffusjonen av analyttene i det kromatografiske systemet som gir smalere topper og høyere effektivitet. Ettersom Glu, GABA og NE ikke hadde grunnlinjeseparasjon ved noen av temperaturene, og retensjonen ikke økte betydelig ved lavere temperaturer, ble det lagt vekt på selektiviteten til 3-MT og 5-HT og den økte effektiviteten. Økt effektivitet og smalere topper gir høyere topper, som kan gi en lavere deteksjonsgrense. Dette er en fordel ved analyse av mikrodialysat hvor konsentrasjonen av neurotransmittere og metabolitter er svært lav. En temperatur på 65 °C ble derfor brukt i metoden.

### **3.1.4.7 Reekvibreringstid**

Når repeterende analyser utføres med gradienteluering, er det viktig at kolonnen reekvibreres til samme utgangspunkt etter at analysen er ferdig. Dersom reekvibreringstiden mellom hver analyse ikke er lang nok, vil sammensetningen av mobilfasen ikke være tilsvarende den foregående analysen, som vil kunne resultere i skift i retensjonstid og endring av toppform. Ulike reekvibreringstider ble undersøkt for to ulike instrumenter, Acquity TQ og Acquity TQ-S. Instrumentene har ulike injeksjonssystemer, hvor Acquity TQ har fast loop injeksjon og Acquity TQ-S har strømning-gjennom-nål injeksjon. Ved strømning-gjennom nål brukes ingen loop, prøven trekkes opp i nålen, nålen føres til injeksjonsporten hvor mobilfase strømmer kontinuerlig gjennom nålen og prøven føres inn på kolonnen med mobilfasen. Ved fast loop dras prøven gjennom sprøyta og inn i en loop, som deretter bytter posisjon og injiserer prøven på kolonnen.

Det ble ikke observert ulikheter i kromatogrammene ved fast loop injeksjon ved ulike reekvibreringstider (fra 0 min til 3 min), men tiden ble likevel satt til 1 min eller lengre for å sikre at ingen variasjoner oppsto. Ved strømning-gjennom-nål injeksjon ble det observert skift i retensjonstider dersom en funksjon kalt «load ahead» ble brukt. Ved load ahead starter forberedelsene for en ny analyse før den foregående analysen er ferdig. Standard analyseforløp viste ikke slike tendenser og reekvibreringstid ble satt til 1 min eller lengre.

### **3.1.4.8 Internstandard**

For å korrigere for variasjoner i MS og tap av analytt ved opparbeiding av hjernevevsprøver ble IS brukt i metoden. Det er ønskelig å anvende en IS så lik analytten som mulig slik at evt. endringer som skjer med IS gjenspeiler endringene som skjer med analytt. Ettersom MS skulle benyttes som detektor i metoden, kunne isotopmerkede IS anvendes. IS som ble brukt til kvantifisering av analyttene er gitt i tabell 7. Det ble valgt å anvende <sup>13</sup>C-merket DA i metoden isteden for d<sub>3</sub>-merket DA. Grunnen til dette er at det har blitt vist at <sup>13</sup>C merket IS i større grad enn deuterert IS opptrer på tilsvarende måte som den umerkede forbindelsen mht. retensjon og optimal kollisjonsenergi i MS (Berg et al. 2014).

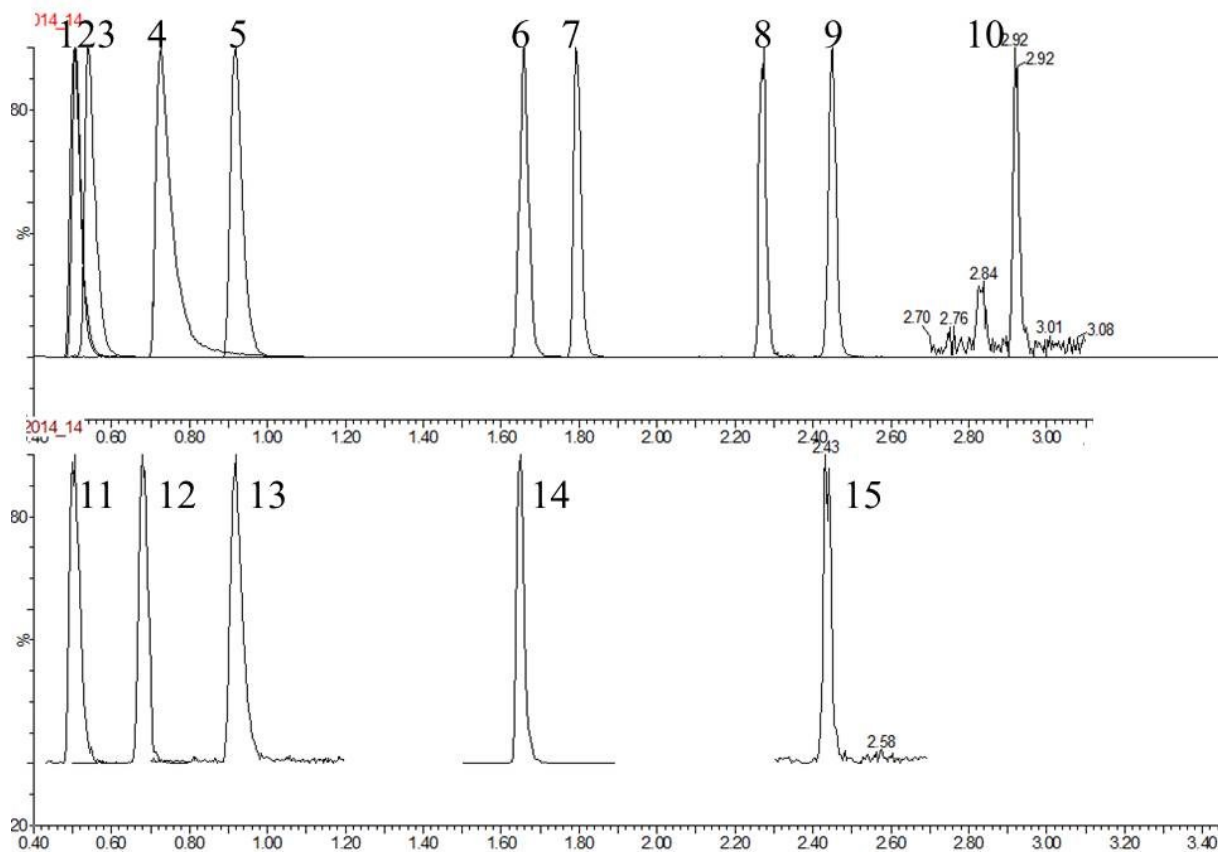
Det viste seg å være for kostbart å anskaffe egne IS for alle analyttene. For neurotransmitterne som ikke hadde egen IS ble IS valgt basert på lignende funksjonelle grupper eller nærliggende retensjonsfaktor. Det ble funnet at det ene UPLC-MS/MS instrumentet

som ble brukt; Acquity UPLC, Xevo TQ-S ikke ga signal for DHBA. Det ble gjort forsøk på å finne alternative MRM overganger, men dette lyktes ikke. Det ble derfor besluttet å bruke DA  $^{13}\text{C}_6$  som IS for ACh ved bruk av dette instrumentet, ettersom de to forbindelsene hadde nærliggende retensjonstider. Kromatogrammer av analytter og IS er gitt i figur 27.

**Tabell 7: Oversikt over hvilke internstandarder som ble benyttet til de ulike analyttene.**

Analytt	Internstandard
5-HT	5-HT-d <sub>4</sub> , DHBA†
5-HIAA	5-HIAA-d <sub>5</sub> , DHBA†
DA	DA- $^{13}\text{C}_6$ , DA-d <sub>3</sub> †
DOPAC	5-HIAA-d <sub>5</sub> , DA-d <sub>3</sub> †
HVA	5-HIAA d <sub>5</sub> , DA d <sub>3</sub> †
ACh	DHBA eller DA- $^{13}\text{C}_6$ *
NE	GABA-d <sub>6</sub>
Glu	GABA-d <sub>6</sub>
GABA	GABA-d <sub>6</sub>

†Brukt som IS ved undersøkelse av ulike fellingsmetoder \*DHBA ble brukt som IS ved bruk av Acquity Xevo TQ, og DA  $^{13}\text{C}_6$  ved bruk av Acquity Xevo TQS



Figur 27: TIC av standardløsning 12 for analyse av hjernehomogenat (tabell 24 i kapittel 6.2.3 i appendiks) og IS separert på en HSS T3 kolonne med en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5 µL. Gradientprofilen var tilsvarende som beskrevet i figurtekst 21. De nummererte toppene var hhv.: Glu (1), GABA (2), NE (3), ACh (4), DA (5), 5-HT (6), 3-MT (7), DOPAC (8), 5-HIAA (9), HVA (10), GABA-D<sub>6</sub> (11), DHBA (12), DA-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (13), 5-HT-d<sub>4</sub> (14) og 5-HIAA-d<sub>5</sub> (15).

### 3.1.4.9 De optimaliserte RP metodene

Ulike tiltak ble utprøvd for å øke retensjonen av GABA, Glu og NE. Gradienter hvor andelen vandig buffer var 100 % ved start, lavere temperaturer, ulike buffere (ammoniumformat pH 3,1, 25 mM FA og ammoniumacetat pH 5) og ulik organisk fase (ACN og MeOH) ble undersøkt, men ingen av disse tiltakene økte retensjonsfaktoren for forbindelsene betydelig.

Best selektivitet, effektivitet og MS-signal ble oppnådd ved bruk av gradienteluering med en mobilfase bestående av 25 mM FA og metanol. Mikrodialyseprøver inneholder lave konsentrasjoner av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter og det var viktig at instrumentet som ble brukt til analyse hadde så høy følsomhet som mulig. Dette var ikke så kritisk ved analyse av hjernevev ettersom konsentrasjonen av neurotransmittere her er mye høyere. Det ble av denne grunn laget en metode for bestemmelse av neurotransmittere og

metabolitter i mikrodialysat på to Acquity UPLC, Xevo TQ-S instrumenter og en annen metode for bestemmelse av neurotransmittere og metabolitter i hjernevev på et Acquity UPLC, Xevo TQ instrument og et Acquity UPLC, Quattro Premier XE instrument. Xevo TQ-S er ca. 10 ganger mer følsom enn Xevo TQ, som igjen er mer følsom enn Quattro Premier XE. Xevo Q-S vil derfor gi en lavere deteksjonsgrense og større sannsynlighet for å detektere neurotransmitterne i mikrodialysat.

En ulempe med Acquity Xevo TQ-S er at instrumentene som ble benyttet erfaringsmessig gir svært lavt eller ikke signal for negative ioner, med mindre instrumentet nylig har hatt vedlikehold av ionekilde og step-wave. Det ble forsøkt å finne positive overganger for de negative ionene HVA og DOPAC, men uten resultat. Instrumentet ga heller ikke signal for internstandarden DHBA, men det ble besluttet at det var viktigere å ha en metode på Xevo TQ-S hvor de fleste analyttene i mikrodialysat kunne detekteres, enn en metode på Xevo TQ hvor alle analyttene med mindre sannsynlighet kunne detekteres. Det ble derfor laget to ulike gradientprofiler for mikrodialysat og hjernevev (tabell 8 og 9). MRM-overgangene til de negative ionene HVA og DOPAC ble fjernet fra MS-metoden for mikrodialysatanalyse. Som angitt i tabell 8 og 9 var gradientprofilen for mikrodialysat 30 sekunder kortere enn for hjernevev. Et vaskeprogram hvor nålen ble vasket 3 sekunder med MeOH før injeksjon og 6 sekunder med MeOH etter injeksjon ble lagt inn i metoden på instrumentet med strømning-gjennom-nål injeksjon (Xevo TQ-S). På instrumentene med loop ble nål og loop vasket med 600 µL MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90) før injeksjon og 200 µL MeOH/ H<sub>2</sub>O (90/10) fulgt av 600 µL MeOH/H<sub>2</sub>O (10/90) etter injeksjon.

**Tabell 8:** Den optimaliserte gradientprofilen benyttet for analyse av hjernevev, hvor mobilfase A og B var hhv. 25 mM FA og MeOH.

TID (min)	MOBILFASEHASTIGHET (mL/min)	% A	% B
0	0,5	99,5	0,5
0,5	0,5	99,5	0,5
1,2	0,5	90	10
1,5	0,5	80	20
1,9	0,5	75	25
2,8	0,5	40	60
3,2	0,5	20	80
3,25	0,5	0	100
4,25	0,5	0	100
4,26	0,5	99,5	0,5
5,5	0,5	99,5	0,5

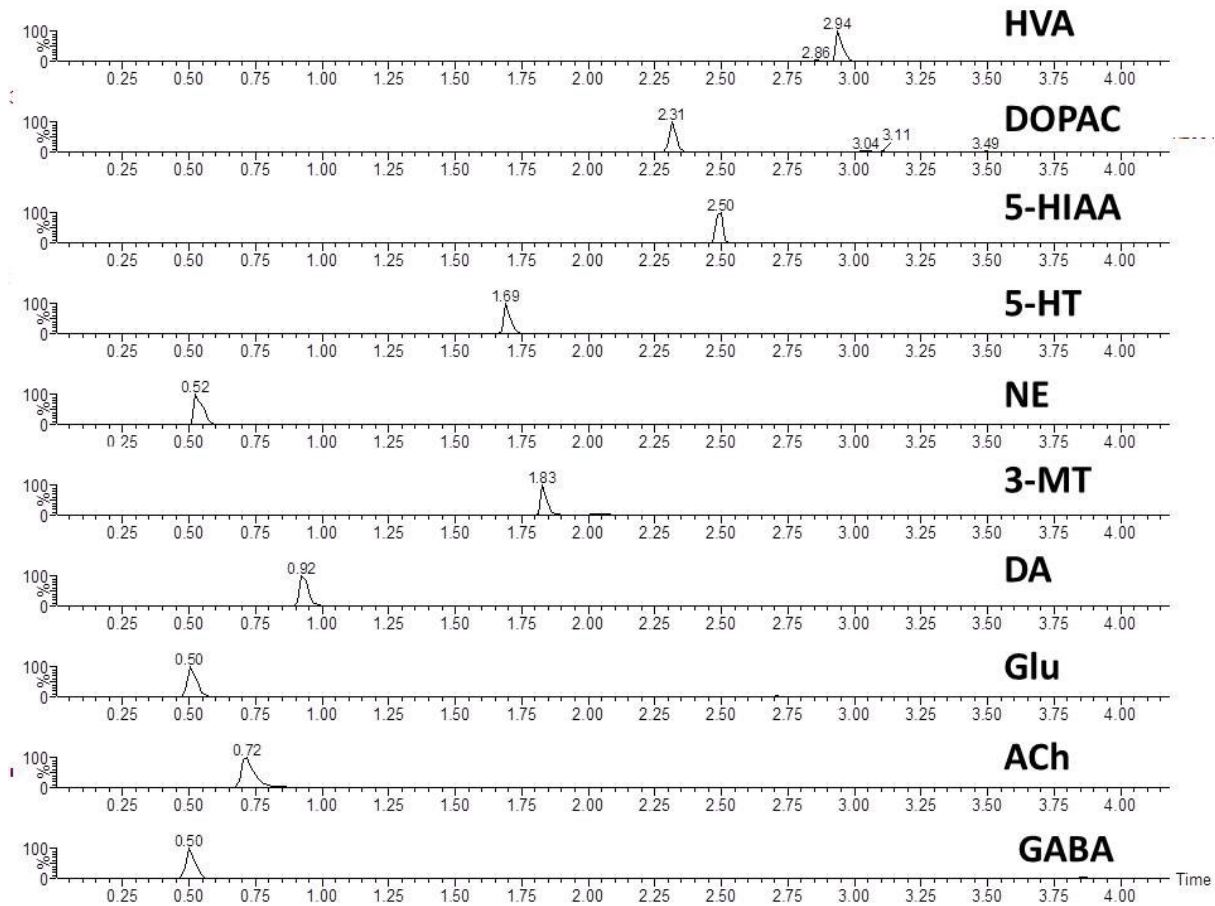


Tabell 9: Den optimaliserte gradientprofilen benyttet for analyse av mikrodialysat, hvor mobilfase A og B var hhv. 25 mM FA og MeOH.

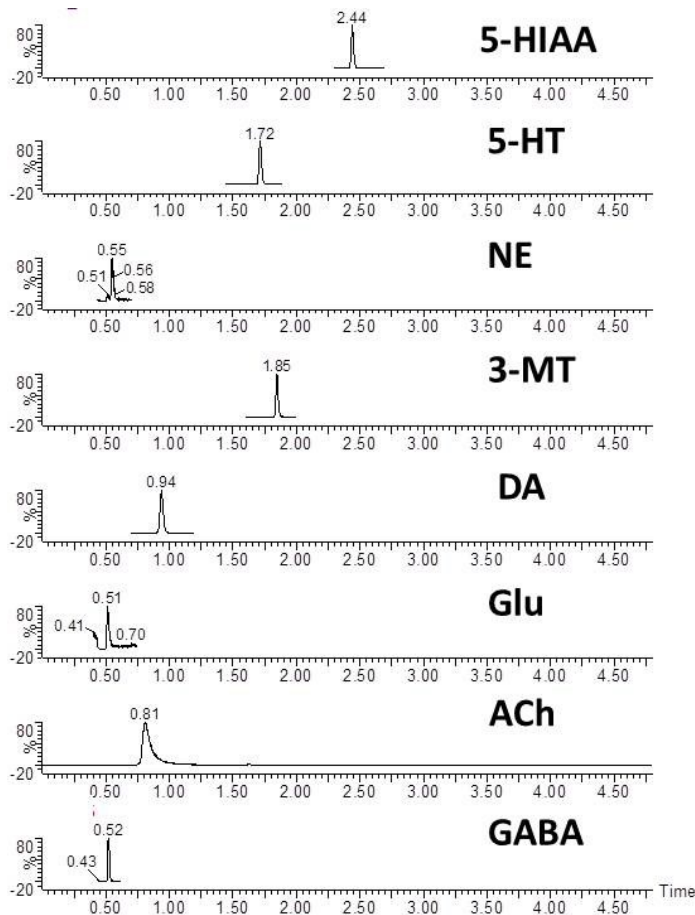
TID (min)	MOBILFASEHASTIGHET (mL/min)	% A	% B
0	0,5	99,5	0,5
0,5	0,5	99,5	0,5
1,2	0,5	90	10
1,5	0,5	80	20
1,9	0,5	75	25
2,8	0,5	40	60
2,9	0,5	0	100
3,9	0,5	0	100
4,0	0,5	99,5	0,5
5,0	0,5	99,5	0,5

Kolonnetemperatur ble satt til 65 °C, og injeksjonsteknikken som ble benyttet ved bruk av PLNO Overfyllingsfaktor ble satt til 3 µL, som er det minste mulige volumet som kan benyttes. I PLNO trekker nålen da kun opp 3 µL i tillegg til det angitte injeksjonsvolumet. Ettersom de innsamlede mikrodialyseprøvene hadde et volum på 10 µL, vil et injeksjonsvolum på 7 µL benytte hele prøven. Det ene Acquity UPLC, Xevo TQ-S hadde ikke injeksjonsloop installert, men injeksjonsvolum ble satt til 7 µL.

I MS-metoden ble det lagt inn at mobilfasestrømmen fra kolonnen i perioden 0,01- 0,4 min, skulle sendes direkte til avfallsdunken for at en mindre andel uretarderte matrikskomponenter fra mikrodialyse- og hjernevevprøver skulle sendes inn i MS og redusere behov for rengjøring av de ulike bestanddelene i MS. Fra 0,4 min til 3,1 min ble mobilfasestrømmen fra kolonnen ført inn i MS, slik at fraksjonen hvor analyttene eluerte ble detektert. Deretter ble mobilfasestrømmen sendt til avfallsdunken frem til 5,2 min analysetid. Mobilfasestrømmen ble igjen sent inn i MS i perioden 5,2 min til analysens slutt ved 5,5 min. Dette ble gjort for å klargjøre instrumentet til neste analyse. Kromatogram av analyttene kromatografert med gradientene er gitt i figur 28 og 29.



**Figur 28:** TIC av  $1\mu\text{M}$  neurotransmittere og metabolitter i  $25\text{ mM}$  FA, separert på en HSS T3 C18 kolonne med en mobilfase bestående av A:  $25\text{ mM}$  FA og B: MeOH . Mobilfasehastighet var  $0,5\text{ mL/min}$ , temperatur var  $65\text{ }^\circ\text{C}$  og injeksjonsvolum var  $7,5\text{ }\mu\text{L}$ . Gradientprofilen som ble benyttet i forbindelse med hjernevevsprøver er beskrevet i tabell 8.



Figur 29: MRM av standardløsning 11 (konsentrasjon gitt i tabell 22 i kapittel 6.2.2 i appendiks), separert på en HSS T3 C18 kolonne ved bruk av en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH . Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7 µL. Gradientprofilen som ble benyttet i forbindelse med dialysatprøver er beskrevet i tabell 9.

GABA, Glu og NE har begrenset retensjon ved separasjon med den optimaliserte metoden (tabell 10). Den lave retensjonsfaktoren skyldes sannsynligvis forbindelsenes hydrofile natur. ACh, GABA, Glu og NE har lave log P verdier (se tabell 2 kapittel 1.2) noe som tilsier at de er svært hydrofile og vil ha begrenset retensjon på en upolar C18 kolonne.

Tabell 10: retensjonsfaktor for neurotransmittere og metabolitter beregnet ved bruk av retensjonstid for analytt og nullretensjonstid bestemt ved injeksjon av ringerløsning.

Analytt	Retensjonsfaktor, k
5-HT	3,2
5-HIAA	5,3
DA	1,3
HVA	6,4
DOPAC	4,8
ACh	0,80
NE	0,30
Glu	0,25
GABA	0,25

Ved analyse av hjernevev utgjør ikke den lave retensjonsfaktoren ( $<1$ ) så stor betydning ettersom konsentrasjonen av neurotransmitter her ofte er svært høy og signalet sannsynligvis vil være høyt nok til å detekteres ved evt. matrikseffekt. Mikrodialysat inneholder derimot uorganiske salter som kan føre til ioneundertrykking av neurotransmitterne som eluerer i front.

#### **3.1.4.10 Metoden sammenlignet med metoder utviklet av andre**

Mange metoder har blitt utviklet av andre for å bestemme nivåene av disse neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene i ulike biologiske matrikser. En UPLC-MS/MS metode for analyse av neurotransmittere i ECV separert på en BEH C<sub>18</sub> kolonne ble utviklet av Santos-Fandila *et al.* (2013). Metoden manglet imidlertid 3-MT, og oppnådde ikke grunnlinjeseparasjon av majoriteten av analyttene. En LC-MS/MS metode for separasjon på en BEH C<sub>18</sub> kolonne ble utviklet for bestemmelse av neurotransmittere og neurotransmitter-metabolitter i cerebrospinalvæske (Kovac *et al.* 2014). Her ble det brukt tidkrevende derivatisering av analyttene, 3-MT og ACh ble ikke målt og analysetid var over tretten minutter lang. González *et al.* (2011) utviklet også en metode med separasjon av neurotransmittere og metabolitter i rottehjerne på en BEH-C<sub>18</sub> kolonne. Neurotransmitterne og metabolittene bestemt med denne metoden var tilsvarende denne oppgaven, men heller ikke her ble DA-metabolitten 3-MT bestemt. De oppnådde bedre separasjon og høyere retensjonsfaktor for analyttene enn i metoden utviklet her, men ioneeringsreagenset heptafluorbutansyre ble tilsatt mobilfasen. Det er kjent at ioneeringsreagenser kan påvirke ioniseringen av analyttene i ionekilden og gi høyere MDK. Dette er ikke forenelig med de lave konsentrasjonene av neurotransmitter som finnes i biologiske prøver. En ultrarask væskrokromatografi (UFLC) metode for bestemmelse av forbindelsene i hjernevev ved separasjon på en Synergi Fusion-RP 80 ODS C<sub>18</sub>-kolonne har blitt utviklet (Wei *et al.* 2014). Metoden inneholdt imidlertid ikke ACh og 3-MT, og analysetiden var så lang som elleve minutter.

En enkel og rask UPLC-MS/MS metode som ikke innebærer tidkrevende derivatisering eller lignende forarbeid har blitt utviklet. Dette er tidsbesparende og en fordel dersom et stort antall prøver skal analyseres. Det har ikke blitt funnet at andre har laget metoder for bestemmelse av alle analyttene i denne oppgaven. Multianalyttmetoder hvor DA og DA-metabolitter blir analysert mangler også generelt DA-metabolitten 3-MT. Metodene som ble

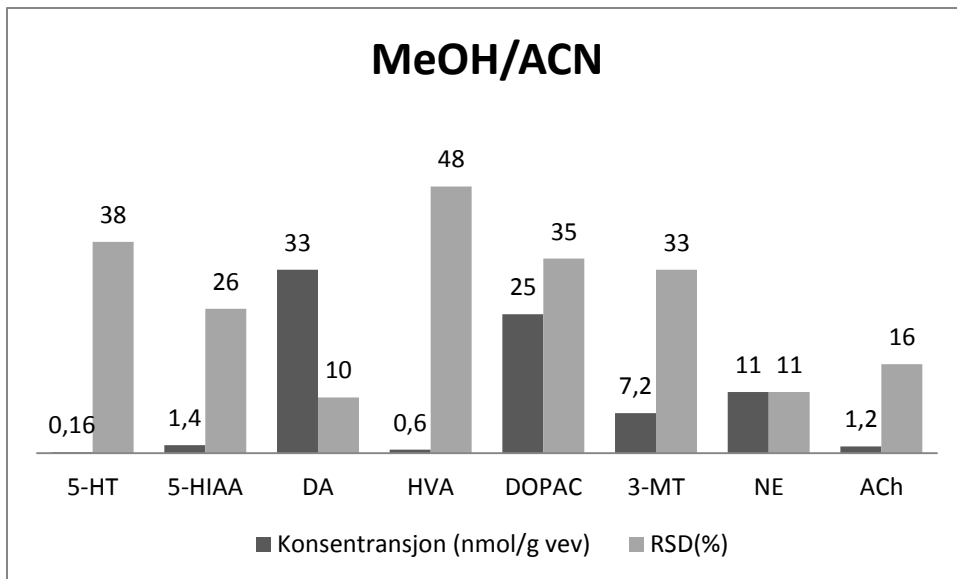
utviklet i oppgaven har kortere analysetid enn lignende metoder. Den utviklede metoden for analyse av hjernevev ga i tillegg grunnlinjeseparasjon mellom sju av de ti analyttene. Tidligere eksisterte det kun metode for bestemmelse av DA ved FHI. Ved bruk av de utviklede metodene blir det nå mulig å forske på hvordan ulike rusmidler påvirker nivåene av andre neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter. Metoden omfatter også flere DA-metabolitter som gjør det mulig å utføre omfattende undersøkelser på hvordan metabolismen av DA påvirkes av rusmidler.

En ulempe med den utviklede metoden er at de negative ionene HVA og DOPAC ga svært dårlig signal som kunne gi vanskeligheter ved kvantifisering av forbindelsene i prøver. Den lave retensjonsfaktoren og koelueringen av GABA, Glu og NE kan føre til ioneundertrykking som medfører høyere MDK/MKK. Dette vil kunne gi problemer med deteksjon av GABA, Glu og NE i ECV.

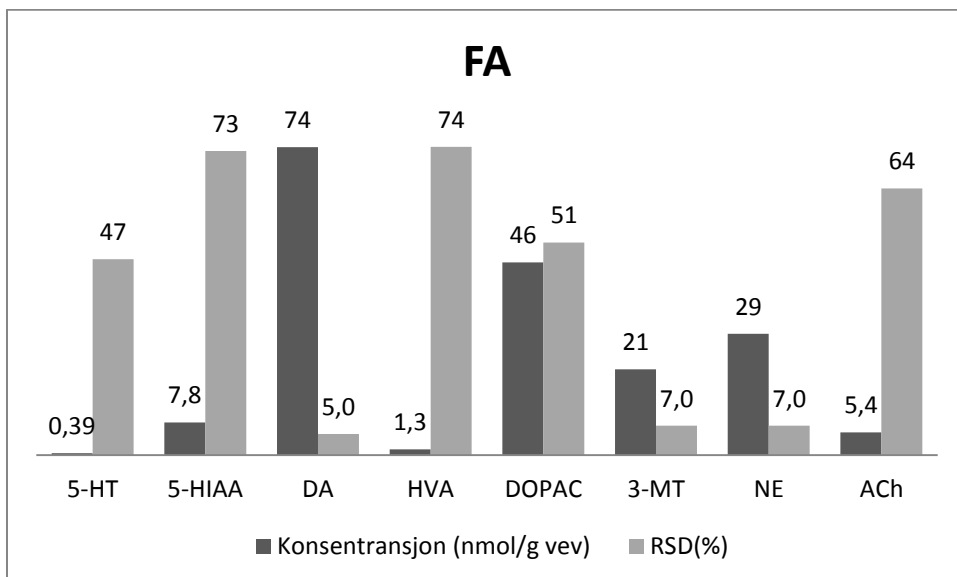
### **3.2 Valg av fellingsmetode for hjernehomogenat**

Proteiner i prøver kan skape problemer ved at de feller ut i kontakt med mobilfase og tetter kolonne og koblinger i det væskekromatografiske systemet. For å undersøke hvilken proteinfellingsmetode som ga høyest gjenfinning av analytt, ble flere ulike fellingsmetoder utprøvd; felling med ACN/MeOH (85/15, v/v), 0,25 M FA og 5 % PCA. Felling med acetonitril og metanol var tidligere blitt benyttet på FHI for felling av hjernehomogenatprøver for bestemmelse av heroin (Karinen et al. 2009).

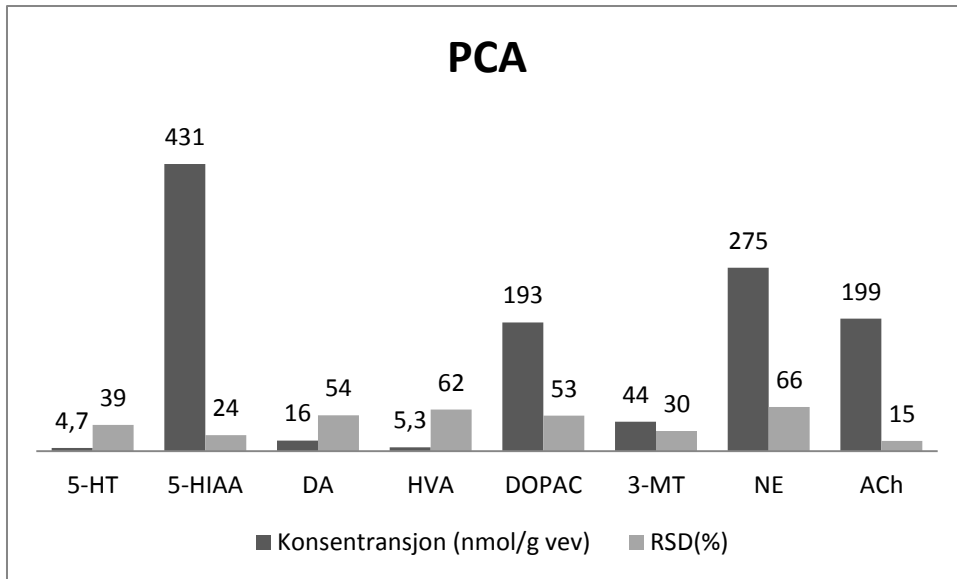
For å undersøke ulike fellingsmetoder ble et hjernehomogenat av striatum fordelt i 18 rør, 6 replikater for hver metode, tilsatt IS, felt og kvantifisert mot kalibratorer som angitt i kapittel 2.6. Gjennomsnittsverdiene for konsentrasjonene av neurotransmitter per gram vev ble beregnet fra målte konsentrasjoner og mengde vev brukt i hvert replikat for hver enkelt metode (figur 30-33). Grubbs test (ligning 2 i kapittel 2.12.1) ble brukt for å undersøke om verdier kunne være uteliggere. Beregninger og statistikk er vist i tabell 26-28 i kapittel 6.3 i appendiks.



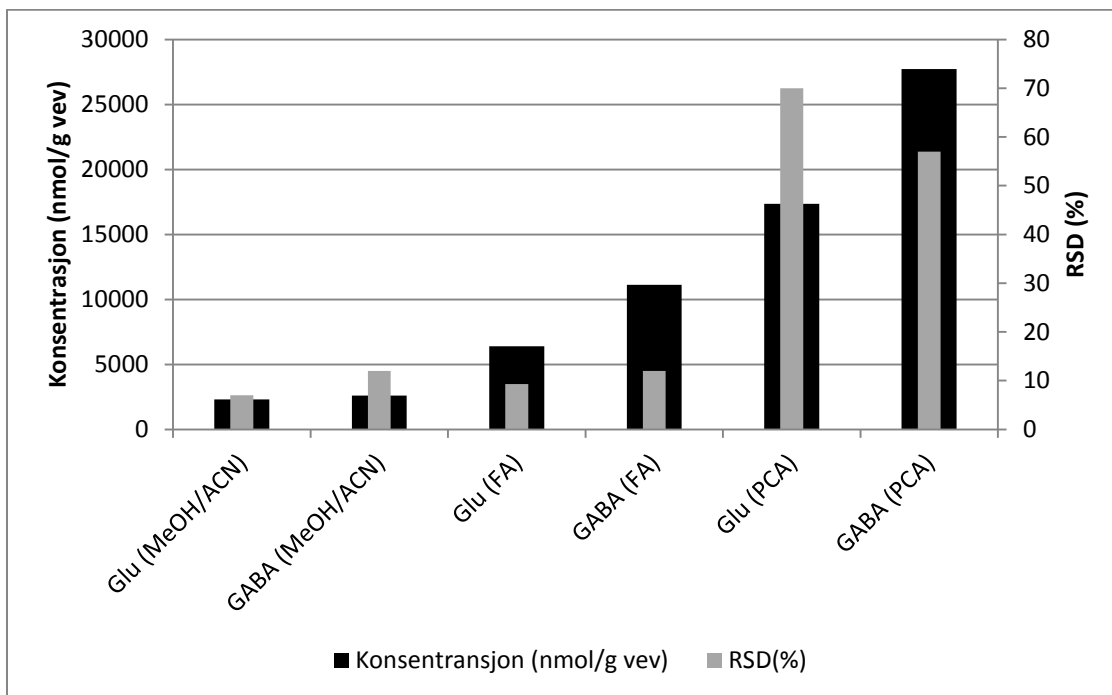
**Figur 30:** Gjennomsnittsverdier av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i striatum, angitt i nmol/g vev, funnet etter felling av homogenisert striatum med ACN/MeOH (85/15, v/v).



**Figur 31:** Gjennomsnittsverdier av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i striatum, angitt i nmol/g vev, funnet etter felling av homogenisert striatum med FA (0,25 M).



Figur 32: Gjennomsnittsverdier av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i striatum, angitt i nmol/g vev, funnet etter felling av homogenisert striatum med PCA (5%).

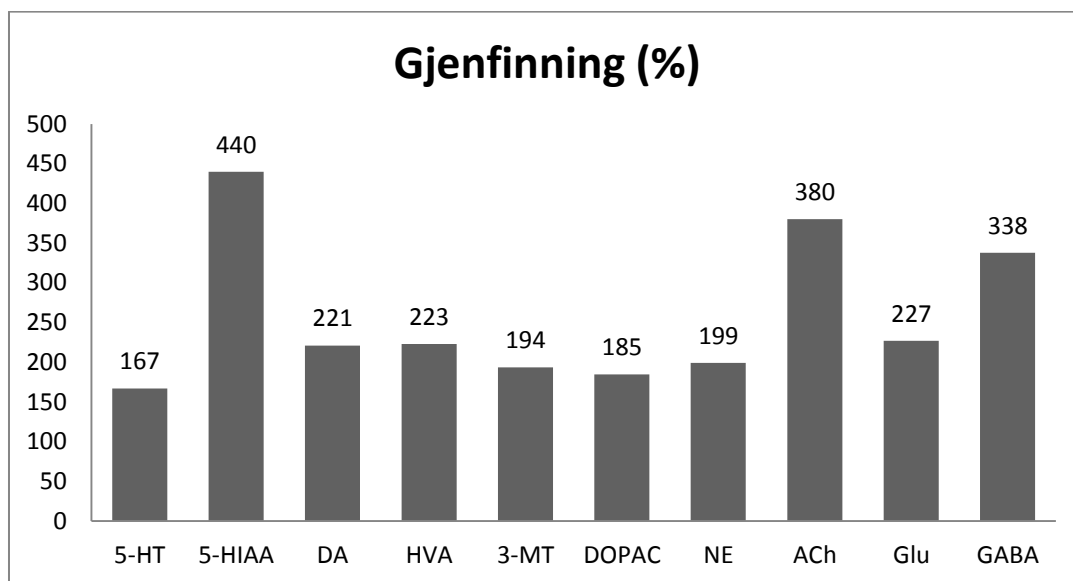


Figur 33: Gjennomsnittsverdier av Glu og GABA i striatum, angitt i nmol/g vev, funnet etter felling av homogenisert striatum med MeOH/ACN, FA og PCA.

Felling med PCA ga svært høye utregnede neurotransmitterkonsentrasjoner. Sammenligning av topphøyder for analytt og IS for de tre metodene viste imidlertid at topphøyden var lavere for de fleste analytter og IS for PCA-felling. RSD for PCA metoden er også over 20 % for alle analytter med unntak av ACh. Dette skyldes at toppene er svært lave og målingene

preges da av stor usikkerhet. De lave toppene kan skyldes at det enten er større mengder proteiner og andre matrikskomponenter tilstede etter felling med denne metoden, noe som kan gi ioneundertrykking og lavere signal, eller at komponentene brytes ned av syren eller har felt ut sammen med proteinene. Det ble også observert endrede retensjonstider sammenlignet med standard. Dette skyldes sannsynligvis den lave pH som endrer protoneringsgraden av analyttene. Av nevnte grunner ble PCA metoden forkastet.

For å sammenligne FA-felling og MeOH/ACN-felling ble MeOH/ACN satt lik 100 % og prosentvis forskjell mellom metodene beregnet (figur 34). FA-felling gir høyest gjenfinning av alle neurotransmitterne og neurotransmittermetabolittene. En grunn dette ga høyest gjenfinning kan være at MeOH/ACN-fellingen består av flere trinn hvor analytt kan gå tapt på veien. Fordi FA-felling ga høyest gjenfinning av analyttene ble det besluttet å bruke denne metoden i videre arbeid. Felling med FA er også enkel og rask, sammenlignet med felling med MeOH/ACN. FA-fellingen består kun av et enkelt sentrifugeringstrinn mens MeOH/ACN-fellingen består av flere sentrifugeringer, inndamping og reløsing av prøven og tar fem ganger så lang tid å utføre.



Figur 34: Prosentvis sammenligning av neurotransmitterkonsentrasjon funnet ved felling med FA relativt til felling med MeOH/ACN.



### 3.3 Validering av metode for analyse av mikrodialysat

Valideringen av mikrodialysatmetoden ble utført i samsvar med retts toksikologiske retningslinjer som beskrevet av Peters *et al.* (2007). Valideringsparametrene som ble undersøkt var hhv. MDK, MKK, linearitet, retensjonsstabilitet, repeterbarhet, intermediær presisjon, overdrag, selektivitet, matrikseffekter og holdbarhet. Valideringen måtte som nevnt i kapittel 3.1.4.9 utføres på et instrument hvor det ikke var mulig å måle på negative ioner. Metoden ble av denne grunn ikke validert for bestemmelse av DOPAC og HVA. Det ble også funnet at intensiteten for NE var betraktelig lavere på dette instrumentet relativt til tidligere målinger på andre instrumenter.

Et stort antall standarder ble benyttet, fordi det var sannsynlig at deteksjonsgrensen og kvantifiseringsgrensen var høyere enn tidligere antatt ved innledende forsøk med analyse av standarder i 0, 1 % FA. Årsaken til dette var at saltene i Ringers løsningen ville kunne gi opphav til matrikseffekter. Et stort antall standarder i det lavere konsentrasjonssjiktet ville kunne gjøre en mer nøyaktig bestemmelse av minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) mulig.

Glu ble ikke tilsatt ved tillagning av arbeidsløsningene. Årsaken var at analyse av dialysat ved basalnivå viste svært høye konsentrasjoner av Glu som ikke var forenlige med nivåene av de andre analyttene i metoden. Det ble likevel besluttet å ta med analytten i validering. En egen arbeidsløsning med Glu ble laget og tilsatt bruksløsningene.

#### 3.3.1 MDK

MDK er definert som den minste konsentrasjonen analytt som kan detekteres. MDK ble i utviklingen av metoden fastsatt til å være den konsentrasjonen av analytt som gir et S/N på tre eller høyere med en definert kromatografisk topp. Standarder i Ringers løsning med stigende konsentrasjon (tabell 22 og 23 i kapittel 6.2.2 i appendiks) ble fortynnet på tilsvarende måte som prøvene (1+1 med 25 mM FA), analysert og S/N for tre løsningsreplikater bestemt ved bruk av programvaren. Bestemt MDK, og mengde analytt injisert på kolonnen er gitt i tabell 11.

Tabell 11: Minste detekterbare analyttkonsentrasjon samt tilsvarende mengde analytt injisert på kolonnen.

Analytt	MDK (nM)	MDK (ng/mL)	Injisert på kolonnen (pg)
5-HT	0,50	0,09	0,31
5-HIAA	3,8	0,72	2,5
DA	0,77	0,12	0,41
3-MT	0,50	0,10	0,36
NE*	19	3,3	11
ACh	0,50	0,07	0,26
Glu	55	8,1	28
GABA*	14	1,5	5,2

\*Ingen støy i kromatogram, signal til støy umulig å måle, men konsistent topp over måling av 10 replikater

Ved sammenligning med tabell 3 i kapittel 1.5 kan det konkluderes med at metoden har lav nok MDK til å detektere basalnivåer av Glu, GABA, 5-HIAA og 3-MT i alle hjerneområder og DA, 5-HT og ACh i noen hjerneområder. NE har derimot for høy MDK og nivåene av NE som finnes i mikrodialysatprøver vil ikke kunne måles.

MDK nivåene som ble funnet er lavere enn for RP-UHPLC-MS/MS metoden for bestemmelse av neurotransmittere og metabolitter i mikrodialysat utviklet av Santos-Fandila (2013). MDK i metoden utviklet i oppgaven var riktignok høyere enn i RP-LC-MS metodene utviklet av Greco *et al.* (2013) og Syslová *et al.* (2011) men her ble hhv. tidkrevende derivatisering og frysetørking brukt. MDK i Syslovás metode ble også definert som det tredobbelte av signalet til en blank prøve. Denne metoden kan gi en MDK som er lavere enn i realiteten. Responsen til ulike analytter kan være svært forskjellig til tross for at konsentrasjonen er den samme, og dette vil ikke gjenspeiles i målinger av blanke prøver. Det er ikke gitt i artikkelen om det er undersøkt at det er en definert topp ved oppgitt MDK. I tillegg er metodene til Santos-Fandila *et al* og Syslová *et al* kun utviklet for bestemmelse av monoaminer og dopaminmetabolitter.

Grunnen til at deteksjonsgrensene ikke var lavere er sannsynligvis at molarmassen til neurotransmitterne er liten. Fragmentene er av en størrelse som ville kunne ha samme overgang som molekyler fra mobilfase. Kvadrupoler har relativt lav masseoppløsning, og har vanskeligheter med å skille nærliggende masser. Ved bruk av eksempelvis en time of flight (TOF) masseanalysator, ville det vært mulig å separere analyttionene bedre fra andre interferenser. Ionene fra salter i Ringers løsning skaper sannsynligvis ioneundertrykking av

stoffene med lavest retensjonsfaktor (GABA, Glu, NE, ACh og DA). Dersom disse hadde hatt høyere retensjonsfaktor ville sannsynligvis MDK vært lavere for disse forbindelsene. Det ble også observert at signalet til NE var dårligere på instrumentet som ble brukt til valideringen enn observert tidligere.

### 3.3.2 MKK

MKK er definert som den minste mengden analytt som kan kvantifiseres med akseptabel presisjon og nøyaktighet. MKK ble bestemt ved analyse av tre replikater av åtte standarder (tabell 22 og 23 i kapittel 6.2.2 i appendiks for konsentrasjon) per serie, med totalt åtte analyseserier. Seriene ble analysert på ulike dager på to ulike Acquity UPLC, Xevo TQ-S instrumenter. Standardene ble tillaget i Ringers løsning og fortynnet på tilsvarende måte som prøvene (1+1 med IS i 25 mM FA). Kravet for MKK var at RSD skulle være under 20 % og bias skulle være innen intervallet 80-120 %. Bestemt MKK er gitt i tabell 12.

Tabell 12: MKK bestemt ved analyse av åtte standarder i tre replikater over åtte analyseserier.

Analytt	MKK (nM)	MKK (ng/mL)	Injisert på kolonnen (pg)	Gjennomsnitt (nM)	n	RSD (%)	Bias (%)
5-HT	1,0	0,18	0,62	1,0	8	20	101
5-HIAA	12	2,3	8,1	12	8	15	100
DA	1,0	0,50	0,54	1,0	8	12	100
3-MT	2,0	0,41	1,4	2,0	8	19	93
NE	$3,6 \cdot 10^2$	61	$2,1 \cdot 10^2$	364	8	17	101
ACh	0,77	0,07	0,39	0,88	8	13	114
Glu	$1,4 \cdot 10^2$	21	74	154	8	16	108
GABA	57	5,9	21	55	8	17	97

MKK for metoden er lav nok til å kvantifisere basalnivåer av 5-HIAA og Glu i ECV fra alle hjerneområdene, og DA, 5-HT, 3-MT, GABA og ACh i ECV fra noen av hjerneområdene. NE har derimot for høy MKK og nivåene av NE som finnes i ECV vil ikke kunne kvantifiseres. Grunnene til at MKK for NE var høy er tilsvarende som diskutert i kapittel 3.3.1. En høyere retensjonsfaktor for NE vil sannsynligvis gi lavere MKK. Observasjoner under metodeutviklingen ga at et HILIC-system ville kunne gi økt retensjon av NE, samt de andre forbindelsene med lav retensjonsfaktor (Glu, GABA og ACh). MS-tilpassede ioneparingsreagenser kan også brukes for å øke retensjonen.

MKK for GABA, DA, 5-HT, 5-HIAA og Glu er lavere enn i UFLC (ultra rask væskechromafi)-MS/MS metoden utviklet av Wei *et al.*, i tillegg er ikke ACh og NE med i deres metode (2014). Kvantifiseringsgrensen for Glu er lavere i deres metode, men dette er ikke av betydning ettersom Glu kan kvantifiseres i alle hjerneområdene.

### 3.3.3 Linearitet

For å bestemme det lineære området for hver enkelt analytt, ble en rekke av elleve standarder i Ringers løsning (tabell 22, kapittel 6.2.2 i appendiks) analysert i seks løsningsreplikater, hvor de laveste konsentrasjonene ble anslått fra innledende forsøk ved analyse av standarder. Den høyeste standarden, S11, ble brukt for å undersøke om den øvre kvantifiseringsgrensen som er den høyeste konsentrasjonen av analytt som kan kvantifiseres med akseptabel nøyaktighet og presisjon lå nært det interessante konsentrasjonsområdet. Ettersom de fleste neurotransmitterne finnes ved svært lave konsentrasjoner, var det ikke nødvendig med kurve som dekker et område høyere enn S10. Kurvene ble konstruert ved lineær regresjon med vekting  $1/x$  i et spesialtillaget regneark for beregning av linearitet. Kurvenes ligning var  $y = ax+b$ . Kravet for akseptabel linearitet var en korrelasjonskoeffisient på 0,99 og et residual under 20 % for avviket fra kurven for de forskjellige standardene. Lineært område, gjennomsnittlig korrelasjonskoeffisient, samt maksimalt residual for standardene er gitt i tabell 13.

Tabell 13: Lineært område med gjennomsnittlig korrelasjonskoeffisient og residual for analyttene.

Analytt	Lineært område	R <sup>2</sup>	Residual (%)
5-HT	1-210 nM	0,999	12
5-HIAA	37,5-5600 nM	0,994	11
DA	1-210 nM	0,998	19
NE	96-1120 nM	0,988	20
ACh	1-210 nM	0,990	16
Glu	87,5-1750 nM	0,995	12
GABA	60-1400 nM	0,996	14
3-MT	2,5-210 nM	0,997	7,5

Alle neurotransmitterne hadde kurver med R<sup>2</sup> over 0,99, med unntak av NE. Grunnen til at NE ikke viste like god linearitet kan være matrikseffekter grunnet saltene i Ringers løsningen.

Matrikseffektene vil kunne variere mellom analyser og gi spredning i målingene. Det ble også observert at signalet for NE sank da det måtte foretas instrumentbytte. Dette instrumentet har sannsynligvis høyere MKK, slik at det lineære området ble mindre.

### 3.3.4 Retensjonsstabilitet for internstandard

Retensjonsstabiliteten til en internstandard avslører om noe i kromatografien gir opphav til variasjoner mellom analyseserier. Retensjonsstabiliteten for IS ble bestemt ved å beregne variasjonen i retensjonstid for tre løsningsreplikater av standardløsning 2 over seks serier (tabell 14). Kriteriet for akseptabel variasjon var et relativt standardavvik på  $\leq 1\%$ .

Tabell 14: Variasjon i retensjonstid for internstandard over seks analyseserier.

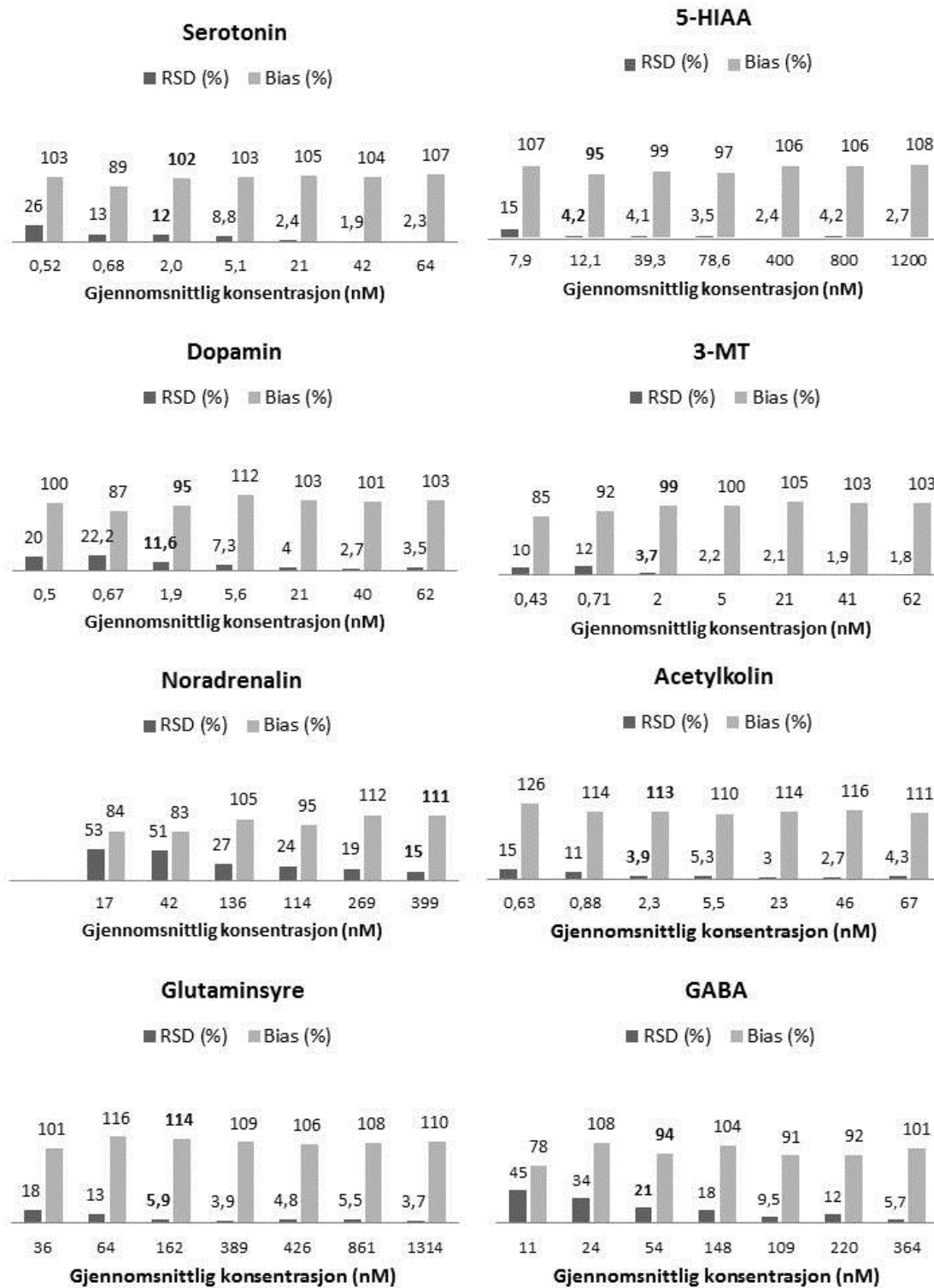
IS	Gjennomsnitt (min)	n	RSD (%)
DA- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	0,91	6	0,58
5-HIAA-d <sub>5</sub>	2,4	6	0,24
5-HT-d <sub>4</sub>	1,6	6	0,47
GABA-d <sub>6</sub>	0,52	6	0,83

Alle internstandardene hadde stabil retensjon med en variasjon under 1 %.

### 3.3.5 Repeterbarhet og nøyaktighet

Repeaterbarhet gir presisjonen under samme operasjonsbetingelser over et kort intervall (Peters et al. 2007). For å bestemme repeterbarhet og nøyaktighet ble standardløsning 12-19 (tabell 23, kapittel 6.2.2 i appendiks), med unntak av standardløsning 14 som ble lagt til ved et senere tidspunkt, fortynnet med IS slik som prøvene (1+1) og analysert i ti løsningsreplikater i løpet av samme dag i samme serie. Kravet for akseptabel RSD og bias var hhv.  $\pm 20\%$  og 80-120 %. Presisjon og nøyaktighet innen serie er vist i figur 35, rådata, beregninger og statistikk er gitt i tabell 29-36 i kapittel 6.4.1 i appendiks. Det ble ikke gjort beregninger for de laveste standardene i tilfeller hvor kvantifiseringen ga en konsentrasjon på 0 nM.

Alle stoffene, med unntak av GABA, viser en tilfredsstillende presisjon og nøyaktighet innen kravet på hhv.  $\pm 20\%$  og 80-120 % ved konsentrasjoner lik eller høyere enn MKK. GABA viser RSD > 20 % ved MKK.



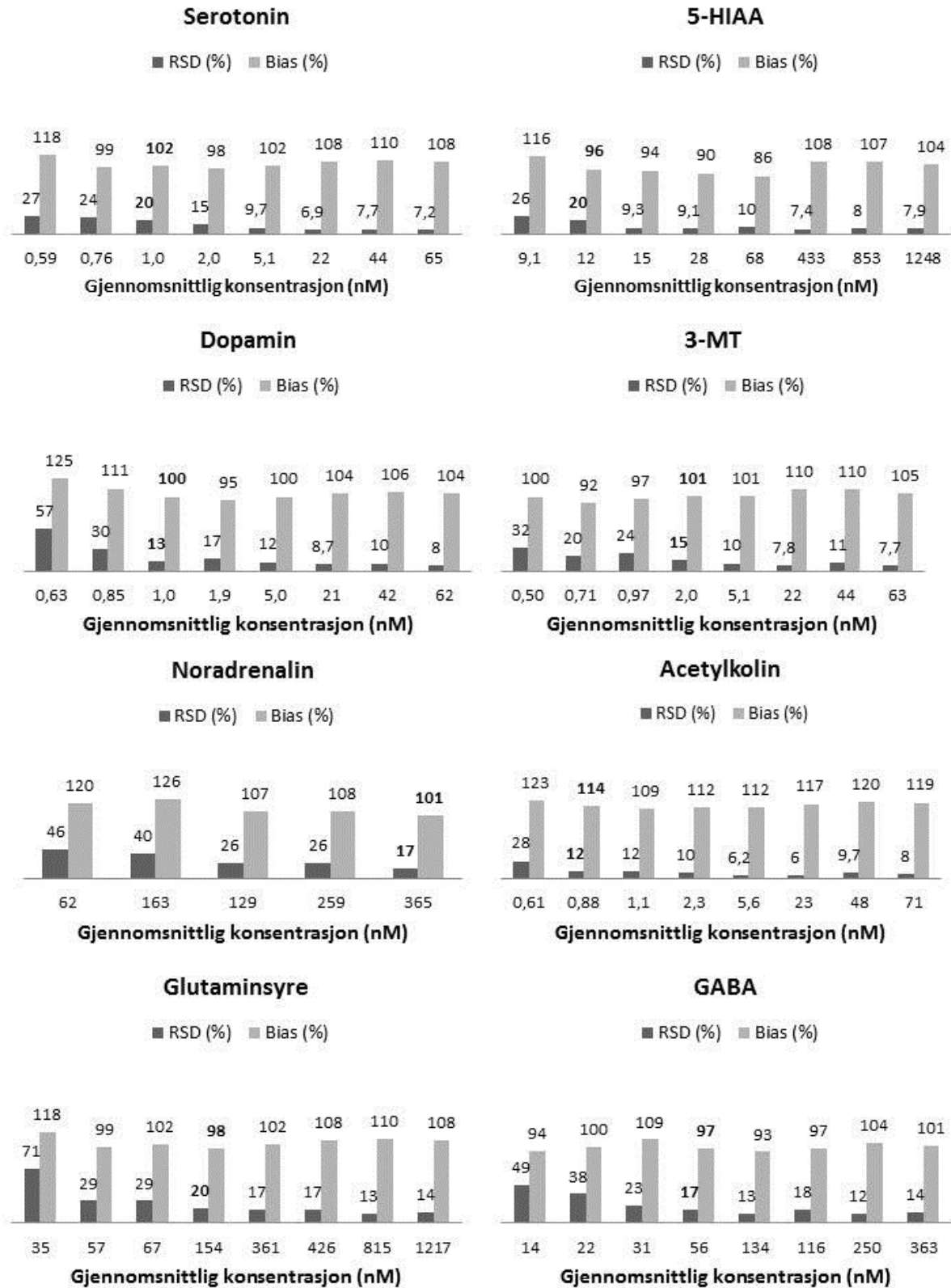
Figur 35: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for bestemmelse av sju standarder i ti løsningsreplikater. Konsentrasjoner lik MKK eller nært MKK er markert med fet skrift.

### 3.3.6 Intermediær presisjon og nøyaktighet

Intermediær presisjon uttrykker variasjonen innen et laboratorium, hvor analysen utføres på ulike dager, av ulike analytikere på ulike instrumenter (Peters et al. 2007). For å bestemme intermediær presisjon og nøyaktighet mellom serier ble standardløsning 12-19 (se tabell 23, kapittel 6.2.2 i appendiks) fortynnet med IS slik som prøvene (1+1) og analysert i tre løsningsreplikater over åtte dager på to ulike Acquity UPLC, Xevo TQ-S instrumenter. Krav for akseptabel intermediær presisjon og nøyaktighet var tilsvarende som i kapittel 3.3.5. Intermediær presisjon og nøyaktighet ble beregnet, og er vist i figur 36. Rådata, Beregninger og statistikk er gitt i tabell 37-44 i kapittel 6.4.2 i appendiks.

5-HT, 5-HIAA, DA, 3-MT, ACh, Glu og GABA har akseptabel presisjon og nøyaktighet innen kravet på hhv.  $\pm 20\%$  og 80-120 % ved konsentrasjoner lik og høyere enn MKK. Det kan som forventet observeres avvikende presisjon og nøyaktighet ved konsentrasjoner lavere enn MKK.

Presisjon og nøyaktighet for NE er utenfor kravet, men MDK for forbindelsen er så høy som 240 nM. Dersom standardene hadde hatt høyere konsentrasjon kunne det vært mulig å undersøke om det var variasjon i signalet nær MKK som ga avvikende presisjon og nøyaktighet. Grunnen til at det kun er oppgitt presisjon og nøyaktighet for fem av de åtte konsentrasjonsnivåene som ble målt for NE er at det var flere av kromatogrammene hvor det ikke var topper. Dette skyldes mest sannsynlig matrikseffekter.



Figur 36: Intermediær presisjon og nøyaktighet bestemt for av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Konsentrasjoner lik MKK er markert med fet skrift.



### 3.3.7 Overdrag

Overdrag er når analytt setter seg et sted i analysesystemet, og frigjøres ved neste analyse. For å undersøke om noen av analyttene ga overdrag ble en standardløsning med konsentrasjon ca. 5 ganger høyere enn standard 11 (tabell 22, kapittel 6.2.2 i appendiks) injisert, etterfulgt av tre blanke prøver bestående av Ringers løsning og 25 mM FA (1+1). Overdrag ble beregnet som prosent i forhold til laveste standard (standard med konsentrasjon lik eller nær MKK), og er gitt i tabell 15.

Tabell 15: Overdrag for analyttene sammenlignet med konsentrasjon lik eller høyere enn MKK, ved injeksjon av standardløsning etterfulgt av tre blanke prøver.

Analytt	Kons. (nM)	Overdrag blank 1 (%)	Overdrag blank 2 (%)	Overdrag blank 3 (%)
5-HT	2,5	9,5	1,9	2,0
5-HIAA	15	576	127	69
DA	1,0	12	6,9	7,3
NE	$5,0 \cdot 10^2$	0	0	0
ACh	1,0	6,8	4,4	3,8
Glu	$1,5 \cdot 10^2$	4,2	4,4	3,7
GABA	$1,1 \cdot 10^2$	0	0	0
3-MT	1,0	11	4,1	5,7

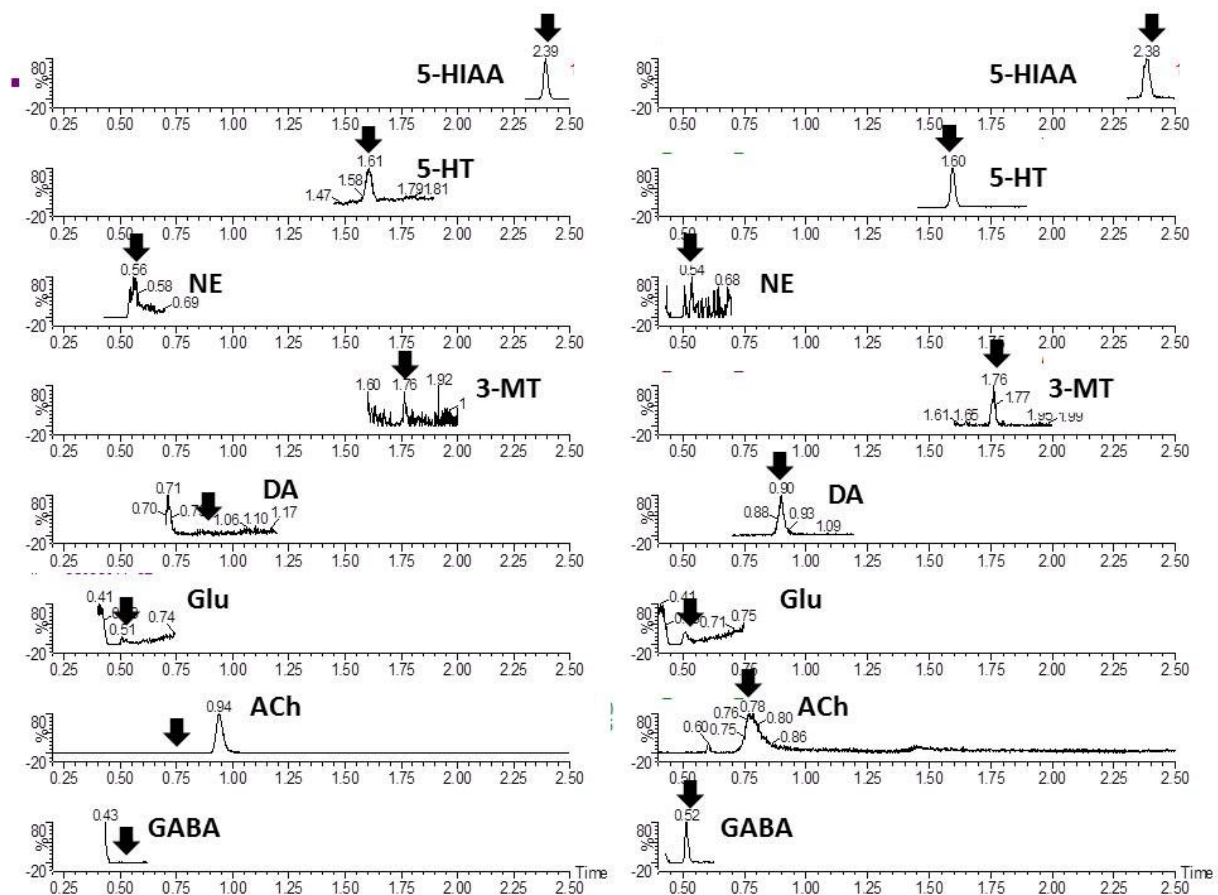
5-HIAA viser stor grad av overdrag i forhold til laveste standard. Ved analyse bør to-tre blanke prøver analyseres etter de høyeste standardene slik at kvantifiseringen ikke påvirkes. Det kan også undersøkes om andre vaskeløsninger på instrumentet gir mindre overdrag. De høyeste konsentrasjonene observert i prøver var ca. 1600 nM, som er kun ca. 6 % av konsentrasjonen i standardløsningen brukt til å undersøke overdrag og ca. 29 % av høyeste standard. Siden konsentrasjonen i prøvene er liten sammenlignet med standardløsningen og høyeste standard er det ikke nødvendig å analysere blanke prøver mellom prøvene. Det kunne vært testet for overdrag med en lavere konsentrasjon, f.eks 2x høyere enn standard 11 for å undersøke om dette ga like stort utslag.

### 3.3.8 Selektivitet

Selektivitet angir om metoden er i stand til å måle og differensiere analyttene uavhengig av andre forbindelser i prøvematriksen. Vanligvis bestemmes selektivitet ved analyse av blanke prøver, men dette er ikke mulig for mikrodialysat, fordi neurotransmitter vil samles opp ved prøvetakningen. Seks prøver av mikrodialysat ved basalnivå oppsamlet i løpet av en natt, og deretter oppbevart i kjøleskap i 2-3 måneder ble analysert for å bestemme selektivitet. Fordi

det ikke ble utført mikrodialyseforsøk på dette tidspunktet var det ikke tilgang til ferskt materiale.

Ettersom mikrodialyseprøvene ikke var ferske ville de sannsynligvis inneholde mindre neurotransmitter, fordi forbindelsene er kjent for å være ustabile og lett dekomponere. Det ville kunne undersøkes om stabile metabolitter, nedbrytningsprodukter, urenheter eller andre matrikskomponenter interfererte ved deteksjon og identifikasjon av neurotransmitterne, ved at kromatogrammene ble sammenlignet med kromatogrammer av standarder. Et kromatogram av mikrodialysat, sammenlignet med et kromatogram av en standardløsning er gitt i figur 37.



**Figur 37:** TIC/MRM av standard 18 (høyre) og mikrodialysat (venstre), separert på en HSS T3 kolonne med mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: MeOH. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7 µL. Gradientprofil var tilsvarende som beskrevet i tabell 9. Retensjonen av analytt er markert med sorte piler.

Det kan observeres topper for flere av neurotransmitterne og metabolittene i kromatogrammet av mikrodialysat. Dette kunne observeres for alle forbindelsene i noen eller alle kromatogrammene fra de seks analyserte mikrodialysatprøvene. MRM ble brukt ved deteksjonen, og gjør at metoden er selektiv for neurotransmittere. Kun forbindelser med

samme fragmenteringsmønster og masse detekteres av MS. For forbindelsene som ble detektert i mikrodialysatet, og ga store topper med topphøyde over MKK var også sekundærionet tilstede. Det kan da med stor sannsynlighet konkluderes med at disse toppene i kromatogrammene er fra analyttene og ikke andre forbindelser. For mindre topper under MKK, hvor ikke sekundærionet vist som en definert topp, er det mer usikkert om toppene var fra analyttene. I kromatogrammet av ACh vist i figur 37, kan det observeres en stor topp ved 0,94 minutter. I kromatogrammer hvor både denne toppen og ACh-toppen var tilstede, hadde toppene grunnlinjeseparasjon. Denne toppen påvirker derfor ikke deteksjon og identifikasjon av ACh.

Det kan ikke med sikkerhet konkluderes med at andre forbindelser interfererer med kvantifiseringen av analyttene fordi analyttene er tilstede i mikrodialysat. Derimot var det ingen forbindelser med nærliggende retensjonsfaktor som påvirket bestemmelsen av analyttene.

### 3.3.9 Matrikseffekter

I LC-MS analyser er matrikseffekter som undertrykking eller forsterkning av analyttsignalet under ioniseringen et velkjent fenomen, og avhenger hovedsakelig av prøvematriks, prøveopparbeidingsmetode, kromatografisk separasjon, mobilfaseadditiver og hvilken ionisering som brukes (Peters et al. 2007). For å undersøke eventuelle matrikseffekter ble to ulike forsøk utført. I forsøk 1 ble det undersøkt om saltene i Ringers løsning brukt ved mikrodialyse ga matrikseffekter ved å tillage standardløsning 15-19 (tabell 23, kapittel 6.2.2 i appendiks) i hhv Ringers løsning og 25 mM FA, tilsette IS og analysere tre replikater av hver løsning. I forsøk 2 ble det undersøkt om metabolitter og andre matrikskomponenter i dialysatet ga matrikseffekt ved å tilsette standard 8 og 11 til 2-3 mnd gammelt mikrodialysat og Ringers løsning. Fordi det var lite mikrodialysat igjen, ble ulike prøver brukt i forsøket. Ettersom mikrodialysatprøvene kan inneholde analyttene, kan resultatene fra dette forsøket kun gi indikasjoner på om interferenser i dialysatet gir matrikseffekter.

For å beregne om matrikseffekter oppsto, ble ligning 3 benyttet:

$$ME(\%) = \frac{B}{A} * 100 \quad (3)$$

Hvor ME er matrikseffekt i prosent, B er topphøyde for analytt tilsatt i Ringers løsning (forsøk 1) eller mikrodialysat (forsøk 2), og A er topphøyden for analytt tilsatt i mobilfase (forsøk 1) eller Ringers løsning (forsøk 2).

Verdier over 100 indikerte ioneforsterkning av analytt grunnet matrikskomponenter. Verdier under 100 indikerte ioneundertrykking grunnet matrikskomponenter (Matuszewski et al. 2003).  $ME = 100 \pm 20 \%$  ble satt som kriterium for akseptabel matrikseffekt. Ligningen ble også brukt til å undersøke om IS korrigerer for eventuell ioneundertrykking/forsterkning. Korrigert ME ble beregnet ved ligning 4:

$$ME_{Korrigert} = \left( \frac{\frac{C}{D}}{\frac{A}{B}} \right) * 100 \quad (4)$$

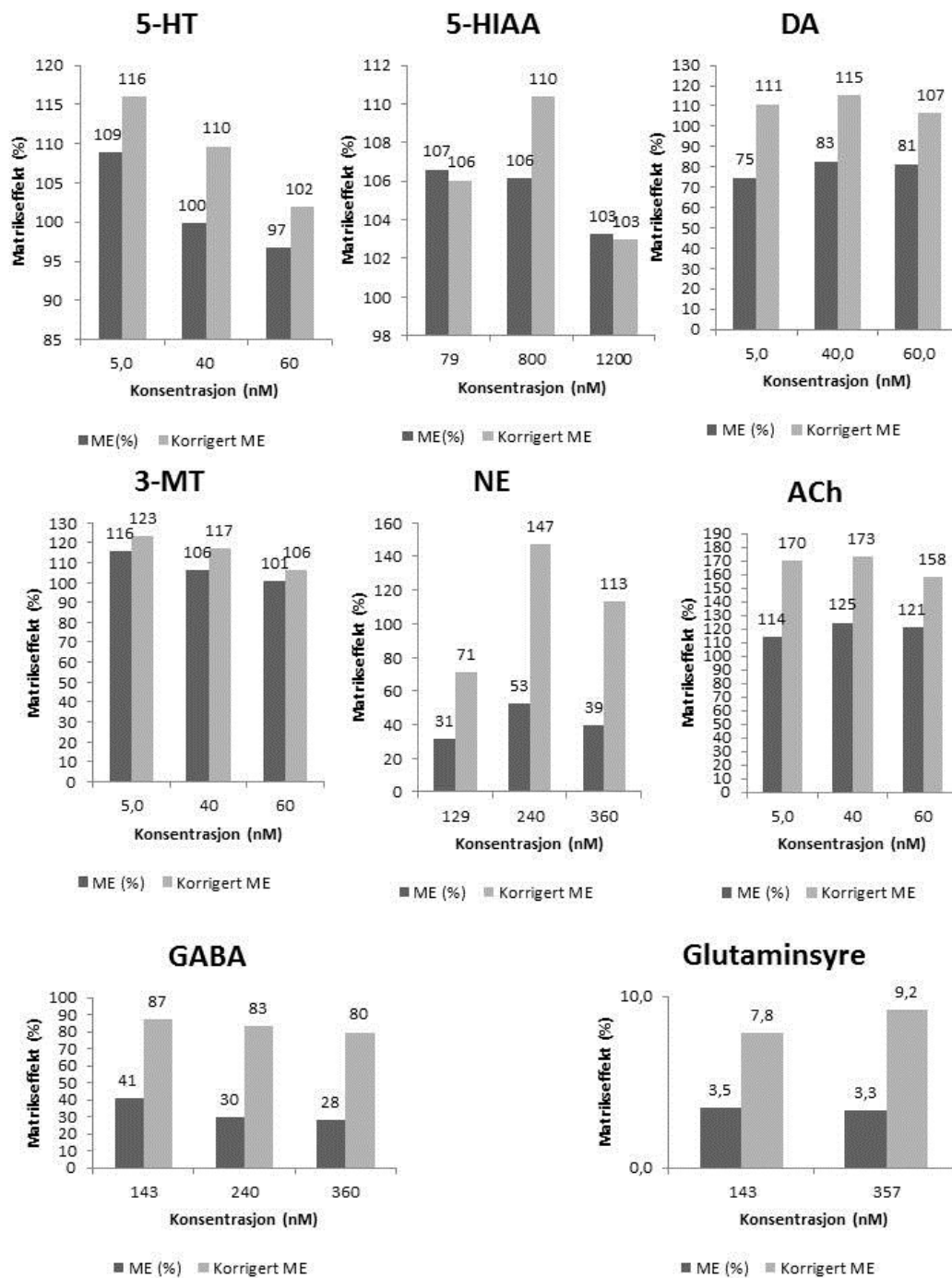
Hvor C er topphøyde for analytt tilsatt i Ringers løsning, D er topphøyde for IS tilsatt i Ringers løsning, A er topphøyde for analytt tilsatt i mobilfase og B er topphøyde for IS tilsatt i mobilfase.

Matrikseffekt og korrigert matrikseffekt for de to forsøkene er vist i figur 38 og 39. Beregninger og statistikk er gitt i tabell 45 og 46 i kapittel 6.4.3 i appendiks.

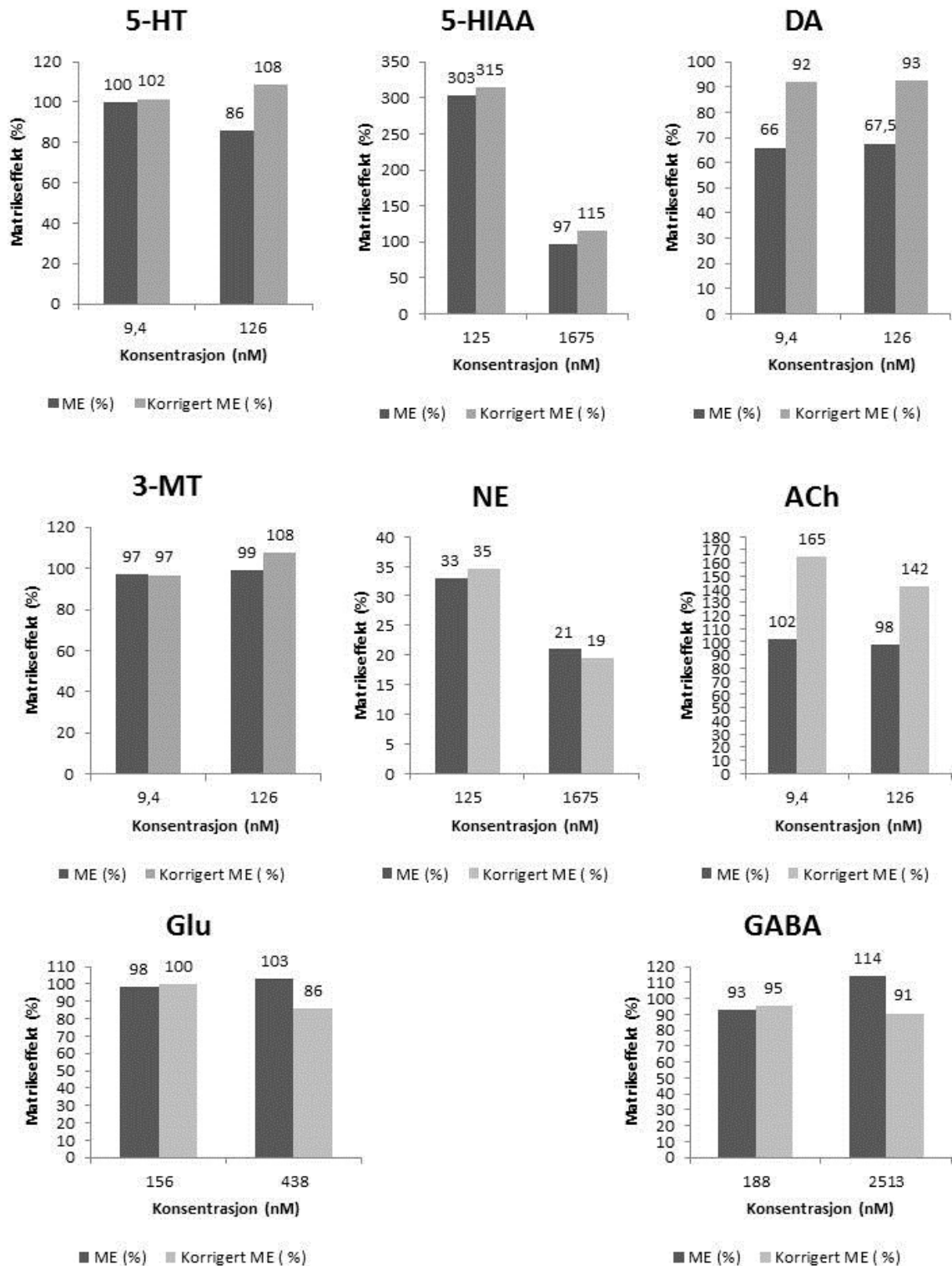
Fra data gitt i figur 38 kan det observeres relativt store matrikseffekter for flere av analyttene. DA, ACh, GABA, NE og Glu har ME verdier som avviker fra kravet. DA og GABA blir imidlertid korrigert for av IS. ACh har ME verdier over 100 som indikerer ioneforsterkning. IS for ACh korrigerer ikke for ioneforsterkningen av ACh og øker matrikseffektene etter korrigering. En mer strukturelt lik eller isotopmerket IS burde vært brukt. Glu og NE har ME verdier lavere enn 80 %, som indikerer ioneundertrykking, og IS korrigerer ikke for ME. Dette var forventet, ettersom forbindelsene eluerer midt i salttoppen fra Ringers løsningen. NE og Glu har heller ikke isotopmerkede IS. IS for 3-MT øker ME og isotopmerket IS bør anskaffes.

Figur 39 viser at mikrodialysat gir ME relativt til Ringers løsning. ME kan observeres for alle stoffene i større eller mindre grad, men blir korrigert for av IS for alle analytter med unntak av 5-HIAA og NE. Grunnen til at 5-HIAA viser en ekstremt høy ME-verdi ved den ene konsentrasjonen, skyldes sannsynligvis at mikrodialysatet inneholdt 5-HIAA før tilsetning av analytt, ettersom det tidligere var blitt observert store topper for 5-HIAA i eldre

mikrodialysat under selektivitetsforsøket. RSD for NE er også svært høyt.



Figur 38: Gjennomsnittlig matrikseffekt for analyttene og IS korrigert matrikseffekt for analytt og IS som funksjon av konsentrasjon for tre replikater ved tre konsentrasjonsnivåer tilsatt i Ringers løsning og mobilfase.



Figur 39: Gjenomsnittlig matrikseffekt for tre replikater av analyttene tilsatt i mikrodialysat relativt til matrikseffekt i Ringers løsning som funksjon av konsentrasjon, ved to konsentrasjonsnivåer beregnet for analytt og IS.

Dette kan skyldes at det er ulike matrikskomponenter i de ulike prøvene som gir undertrykking i ulik grad. Prøvene er tatt ved forskjellige tidsrom og kan være fra ulike hjerneområder, og kan derfor inneholde ulike metabolitter og andre matrikskomponenter.

Det kan observeres at IS for ACh påvirkes av matrikseffekter i mikrodialysat som fører til at korrigerende med IS gir større ME og derfor bør isotopmerket IS for ACh anskaffes. Det kan også observeres at Glu ikke påvirkes av matrikseffekter fra Ringers løsning sammenlignet med mikrodialysat, men påvirkes i stor grad av Ringers løsning sammenlignet med FA.

Det kan konkluderes med at ME for ACh, Glu og NE i forsøk 1 avviker fra kravet på  $ME = 100 \pm 20 \%$ . ME korrigerende med IS avviker også fra kravene, og IS korrigerer da ikke i tilstrekkelig grad for matrikseffekter. Korrigerende av 3-MT gir  $ME > 20 \%$ . Resultatene fra forsøk 2 gir at det er ME over  $\pm 20 \%$  for 5-HIAA og NE. For 5-HIAA skyldes dette sannsynligvis tilstedeværelse av analyttene i dialysatet før tilsetning av analytt, og det kan ikke fastslås med sikkerhet at det er matrikseffekt grunnet andre forbindelser i dialysatet. Korrigerende ME avviker også for NE og 5-HIAA. NE, Glu og ACh har for store matrikseffekter til at de kan kvantifiseres med metoden.

### 3.3.10 Stabilitet

Stabilitet ble bestemt for standardløsninger tillaget i tre ulike løsningsmidler, hhv. 25 mM FA, 0,12 M askorbinsyre og Ringers løsning. Løsningene ble fordelt i tre replikater i brune glassprøverør, av samme type som ble benyttet ved oppsamling av mikrodialyseprøver og til analyse, og satt hhv. på benk, i kjøleskap ( $4^{\circ}\text{C}$ ) og i fryser ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). Holdbarhet på benk, i kjøleskap og frys er vist i figur 40, 41 og 42. Ettersom mikrodialysatprøvene samles opp i små volum ( $\sim 10\mu\text{L}$ ), var det ikke mer prøve igjen etter analyse, og det var da ikke mulig å teste stabilitet for analyttene i prøve.

Stabilitet i løsninger som hadde stått tre dager i autoinjektor ble også undersøkt. Dette ble utført ved å la en serie med standarder for bestemmelse av variasjon mellom serier bli stående i tre dager i autoinjektor ved  $6^{\circ}\text{C}$ , før reanalyse mot nylagede standarder og de tre dager gamle standardene. Holdbarhet etter tre dager i autoinjektor kvantifisert med ferske standarder, og kvantifisert med de tre dager gamle standardene er vist i figur 43 og 44.

Kriteriet for akseptabelt avvik fra konsentrasjon ved start var  $\pm 20 \%$  ved MKK og konsentrasjoner høyere enn MKK.

Som vist i figur 40 hadde noen av analyttene et avvik på over 20 % etter en dag på benk i romtemperatur. De største avvikene var ved konsentrasjonene i nærheten eller under MKK.

Konsentrasjonsbestemmelse i dette området er i utgangspunktet usikker, og avviket kan derfor skyldes variasjoner i målinger og ikke degradering. NE så ut til å være ustabil i alle de tre løsningene, men kalibreringskurvene til NE var ikke lineære, og ble påvirket av matrikseffekter dersom forbindelsen løses i Ringers løsning, det kan derfor ikke konkluderes med at forbindelsen er stabil/ustabil etter en dag på benk. Fordi Glu, 5-HIAA, 3-MT og DA viste avvik større enn 20 % i Ringers løsning, kan ikke standarder og prøver brukes til kvantifisering eller kvantifiseres etter et døgn i romtemperatur. Grunnen til at mengden 3-MT har økt skyldes sannsynligvis nedbrytning av DA. Det er logisk at dette observeres nært MKK, ettersom en endring i konsentrasjon vil gi større utslag her. Løsninger tillaget i askorbinsyre eller FA, viser også avvik som overskrider den akseptable verdien. Det kan fra nevnte resultater konkluderes med at løsninger av neurotransmitterne i Ringers løsning, askorbinsyre og FA ikke er stabile etter et døgn ved romtemperatur.

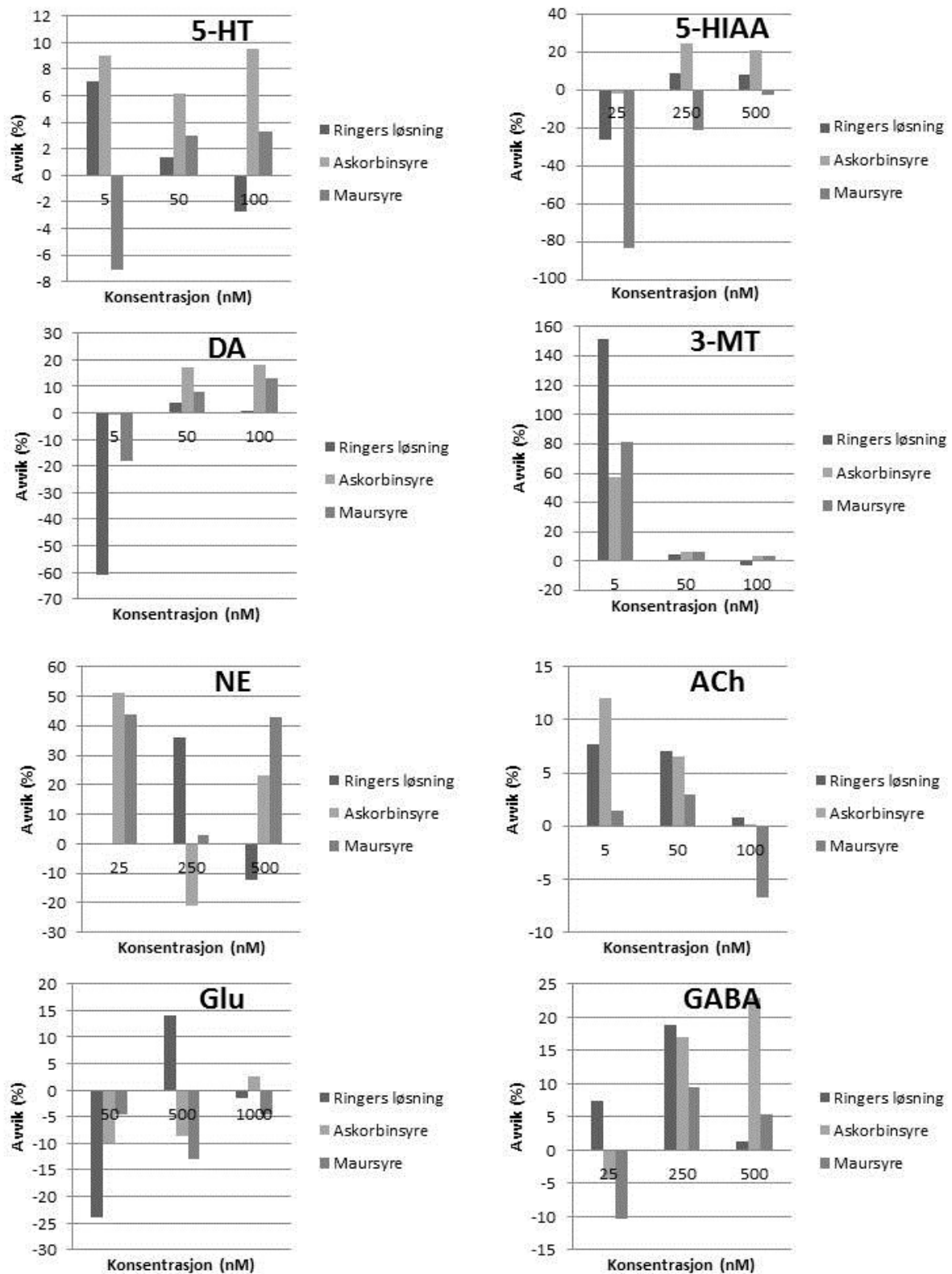
Figur 41 viser at flere av stoffene er ustabile etter en uke i kjøleskap. NE hadde avvikende linearitet og ble sterkt påvirket av matrikseffekter dersom stoffene ble løst i Ringers løsning. Det kan av denne grunn ikke fastslås om forbindelsen er ustabil, ettersom ioneundertrykkingen kan gi variasjoner ved kvantifisering. Stabiliteten av neurotransmitterne og metabolittene var høyest da analyttene var løst i askorbinsyre. Askorbinsyre er en antioksidant som motvirker oksidasjon av 5-HT, DA og metabolittene av disse (Thorré et al. 1997). Neurotransmitterne bør derfor løses i et surt løsningsmiddel tilsatt askorbinsyre for slik å øke stabiliteten.

Resultatene i figur 42 kan indikere at neurotransmitterne er mer stabile i kjøleskap enn i fryser (n=2). Dette ble også observert av Mohringe *et al.* (1986) hvor stabilitet av blant annet DA, 5-HT og 5-HIAA ble undersøkt. Her ble løsninger laget i PCA tilsatt askorbinsyre lagret i kjøleskap og fryser ved hhv, 4 og -18 °C i 20 dager. Data fra forsøket viste at mengden 5-HT og 5-HIAA degraderte i større grad ved -18 °C enn ved 4°C. Det ble også vist at løsninger lagret ved -70°C ikke viste noen endring i konsentrasjon. Forsøk hvor løsninger lagres ved -70 °C bør av denne grunn utføres for å undersøke om stabiliteten øker.

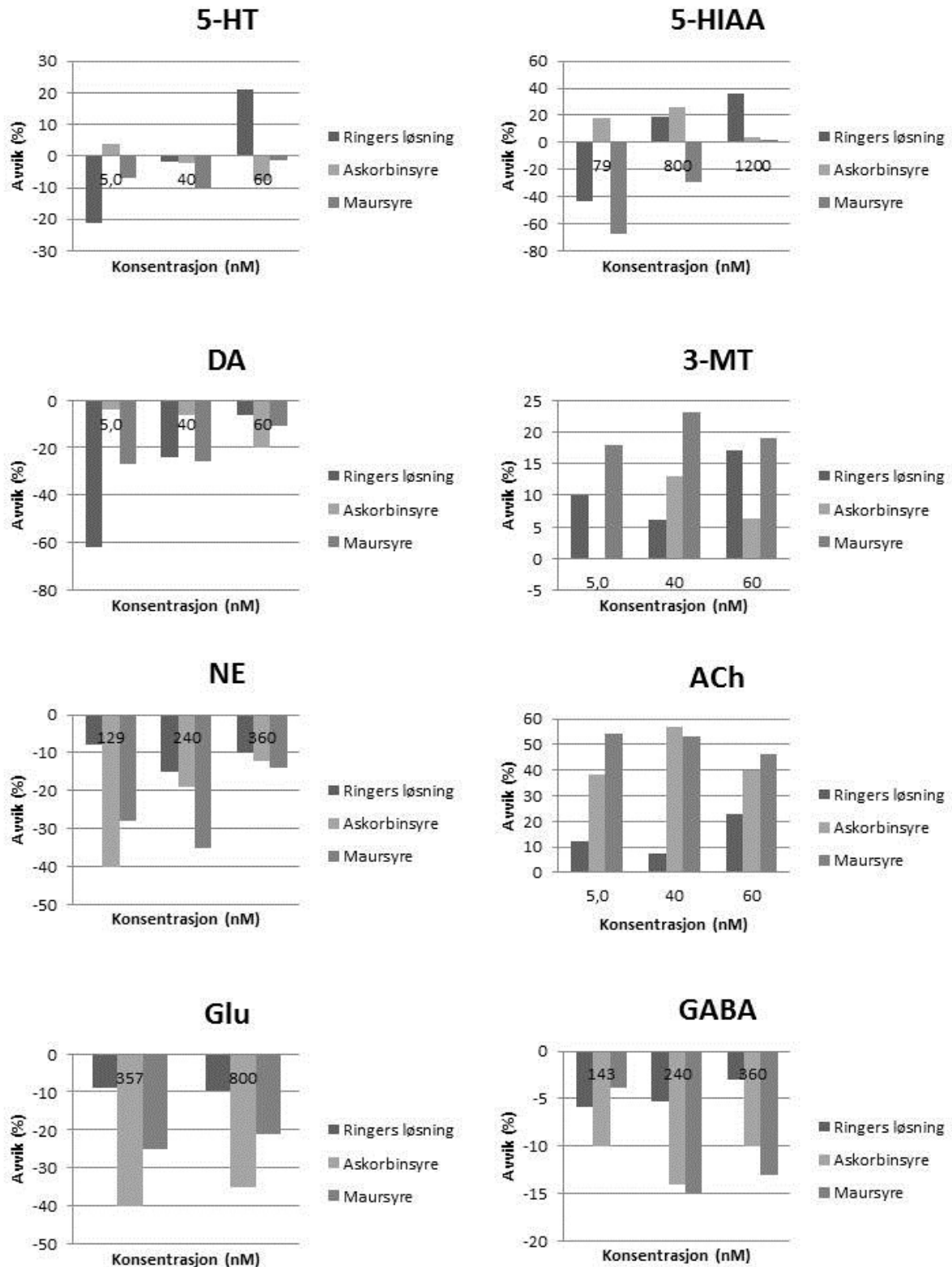
Figur 43 viser at neurotransmitterne og metabolittene ikke er stabile etter tre dager i autoinjektor. Dersom noe galt skjer og en analyseserie stopper, kan den serien ikke reanalyseres og kvantifiseres korrekt med nylagede standarder. Figur 44 viser at en



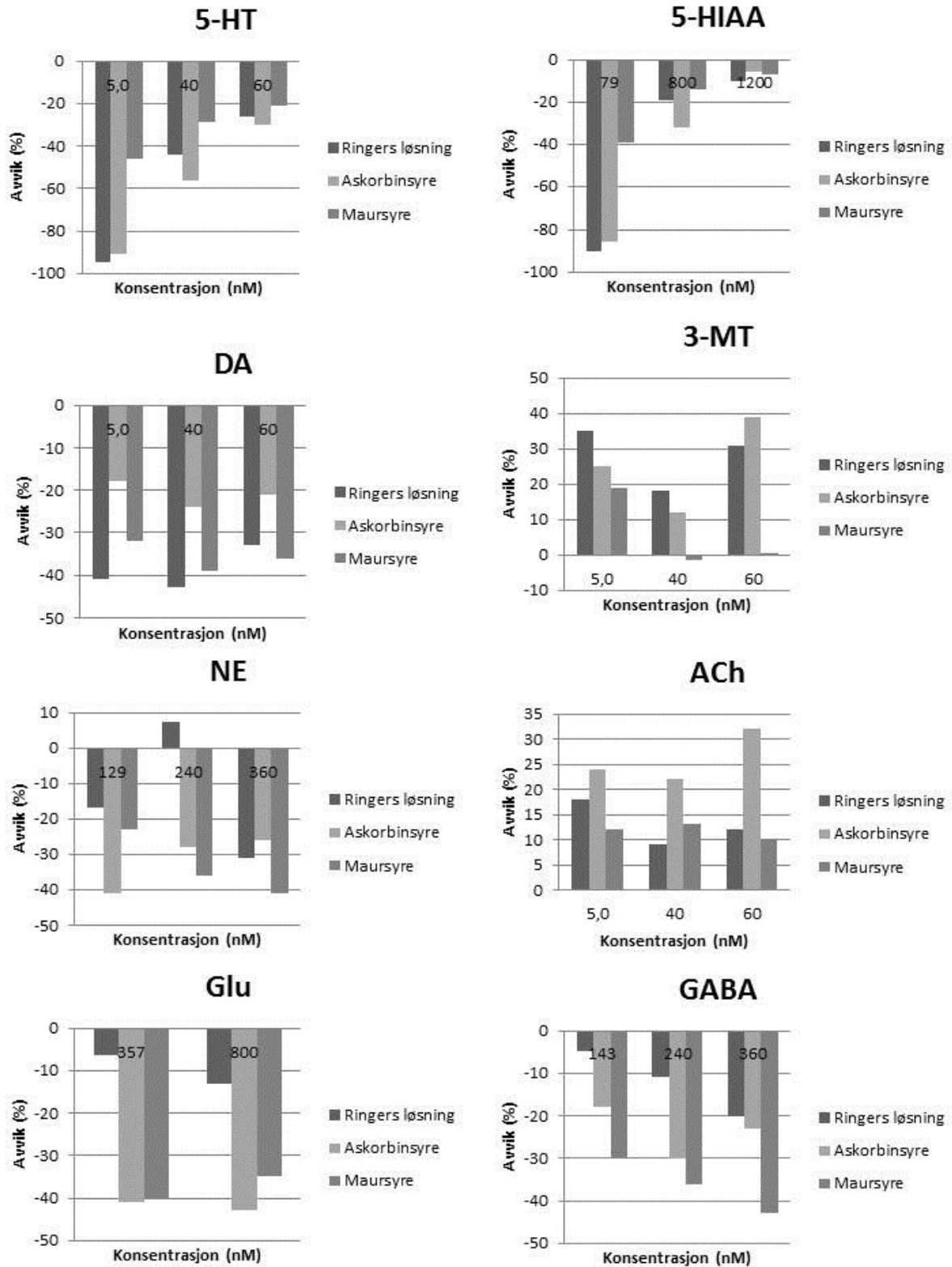
analyseserie som har stått tre dager i autoinjektor heller ikke kan kvantifiseres korrekt mot standarder som også har stått tre dager i autoinjektor. Degradering i standarder og standardløsninger skjer ikke i samme hastighet.



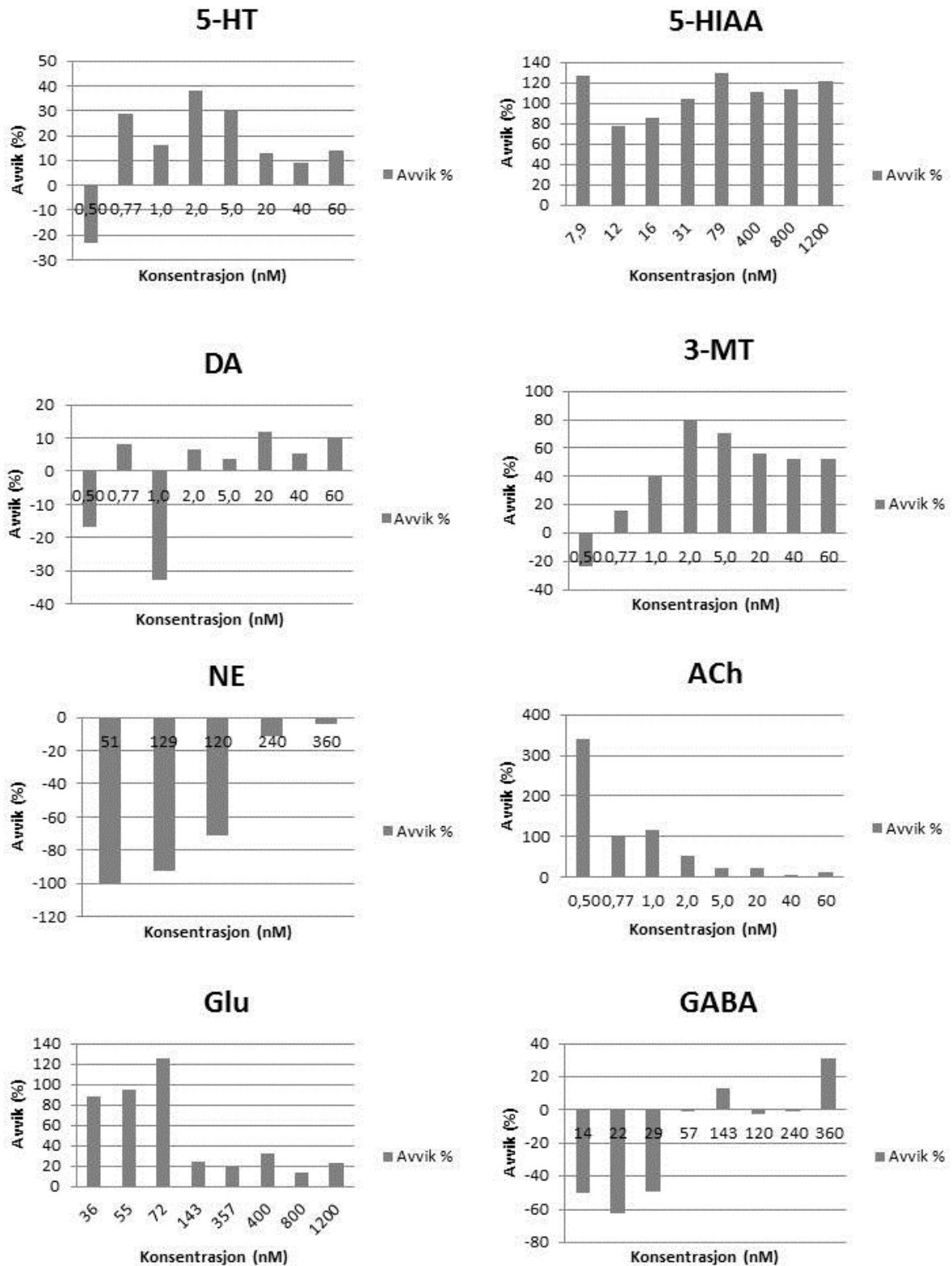
Figur 40: Avvik fra startkonsentrasjon for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene ved tre konsentrasjonsnivåer fortynnet i tre ulike løsningsmidler kvantifisert mot nylagde standarder etter en dag i romtemperatur (n=3).



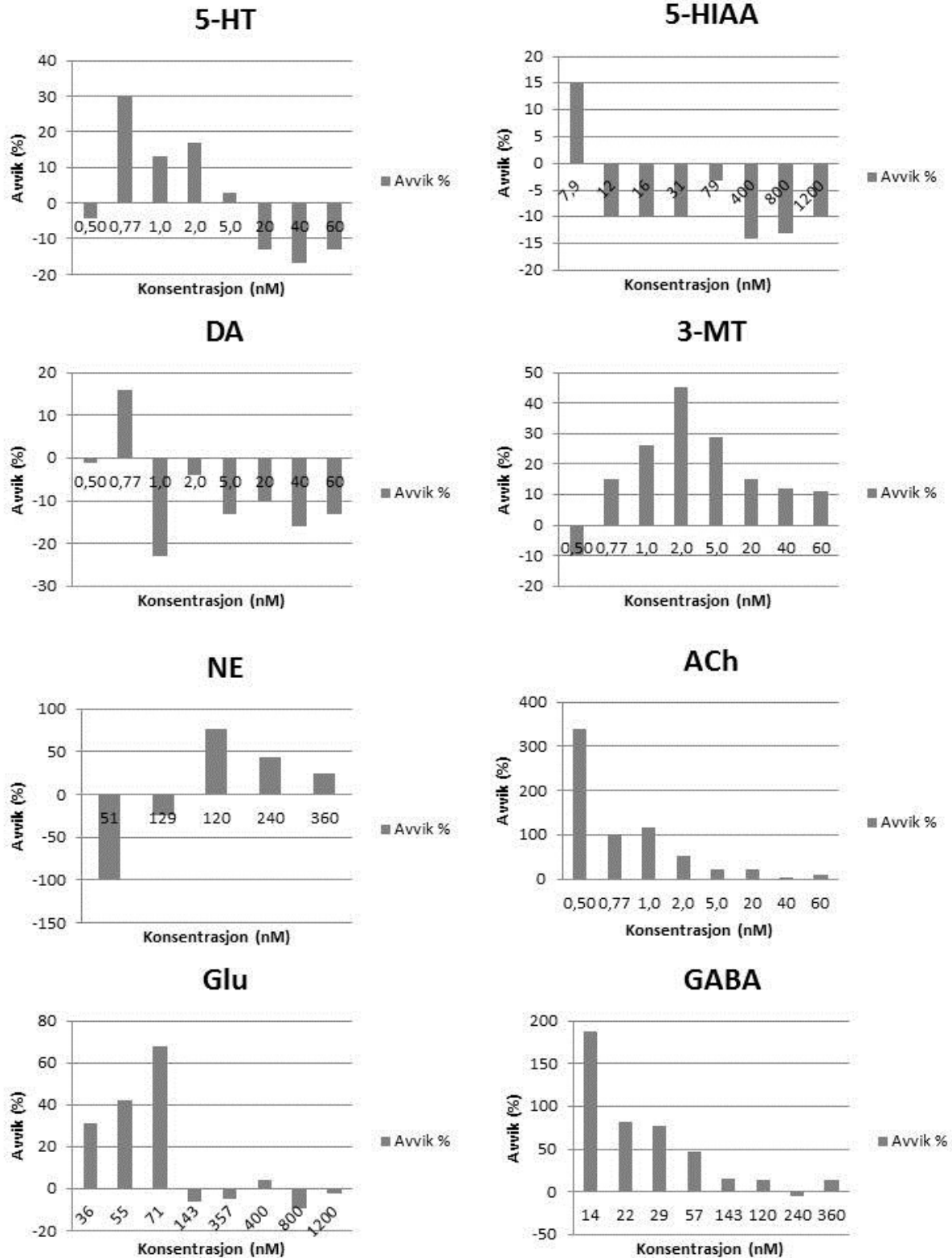
Figur 41: Avvik fra startkonsentrasjon for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene ved tre konsentrasjonsnivåer fortynnet i tre ulike løsningsmidler kvantifisert mot nylagde standarder etter en uke i kjøleskap (n=3). \*Glu ble ikke tilsatt ved tillagning av ny bruksløsning for standarder, og holdbarhet ble derfor undersøkt ved kun to konsentrasjonsnivåer.



Figur 42: Avvik fra startkonsentrasjon for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene ved tre konsentrasjonsnivåer fortynnet i tre ulike løsningsmidler kvantifisert mot nylagde standarder etter en uke i fryser (-20 °C) (n=3). \*Glu ble ikke tilsatt ved tillagning av ny bruksløsning for standarder, og holdbarhet ble derfor undersøkt ved kun to konsentrasjonsnivåer.



Figur 43: Avvik fra startkonsentrasjon for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene ved åtte konsentrasjonsnivåer kvantifisert mot nylagde standarder etter tre dager i autoinjektor (n=3).



Figur 44: Avvik fra startkonsentrasjon for neurotransmitterne og neurotransmitter-metabolittene ved åtte konsentrasjonsnivåer (n=3) etter tre dager i autoinjektor kvantifisert med standarder som hadde stått tre dager i autoinjektor.

### 3.3.11 Konklusjoner fra validering og videre arbeid

Alle forbindelser besto kravene for godkjent validering med unntak av NE og på enkelte punkter GABA, Glu, 3-MT og ACh. NE har for høy MDK/ MKK ift konsentrasjonene av NE som finnes i ECV, avvikende linearitet, for stor variasjon mellom analyser og påvirkes av matrikseffekter. GABA viser avvikende repeterbarhet ved MKK. Repeterbarhet bør undersøkes på nytt for GABA ettersom intermediær presisjon ikke er avvikende for forbindelsen. GABA, Glu, DA og ACh påvirkes av matrikseffekter, men ME som påvirker DA og GABA blir korrigert for av IS. 3-MT får ME etter korrigering med IS. Isotopmerkede IS bør anskaffes for Glu, NE, 3-MT og ACh for å undersøke om det er mulig å korrigere for matrikseffektene. Selv om IS korrigerer for eventuell ioneundertrykking vil fortsatt signalet være nedsatt og MDK/MKK høyere relativt til en upåvirket forbindelse. Av denne grunn kunne det vært interessant å undersøke ioneeringsreagenser ettersom disse kan øke retensjonen på et RP-system, slik at forbindelsene kan separeres fra saltene i ECV. Reagensene kan imidlertid påvirke ioniseringen av analyttene og derav øke MDK og derfor er det viktig å finne et reagens som påvirker deteksjonen minimalt. Observasjoner gjort under metodeutviklingen ga også at et HILIC-basert system med amidkolonne ville kunne gi god retensjon av NE, DA, Glu, GABA og ACh med muligheter for å separere forbindelsene fra saltene i Ringers løsning slik at MKK blir lavere. Utvikling av en separat metode for disse forbindelsene er derfor en mulighet dersom tiltakene nevnt over ikke bærer frem.

Analyttene var ikke stabile i noen av løsningsmidlene eller ved noen av lagringsbetingelsene som ble undersøkt. Flere forsøk bør utføres for å finne om et annet løsningsmiddel eller andre betingelser kan gi høyere stabilitet.

Valideringen ga akseptable resultater for flertallet av neurotransmittere og metabolitter. MKK er lavt nok til å kunne kvantifisere alle analyttene med unntak av NE ved basalnivå i de fleste interessante hjerneområdene og metoden bør derfor testes ut ved analyse av flere reelle prøver.

### 3.4 Validering av metode for analyse av hjernevev

Metoden for analyse av hjernevev ble ikke fullstendig validert ettersom det ikke var tilstrekkelig med tid. Valideringsforsøkene ble utført på to ulike instrumenter (Acquity UPLC Quattro Premier XE og Acquity UPLC, Xevo TQ MS) grunnet instrumentproblemer. Quattro Premier XE er ca. 10 ganger mindre følsom enn Xevo TQ MS. Quattro Premier XE ble brukt under linearitetsforsøket, samt til å analysere tre av seriene som ble brukt til å bestemme intermediær presisjon og nøyaktighet. Xevo TQ MS ble brukt til å bestemme repeterbarhet, samt analyse av to serier for bestemmelse av intermediær presisjon og nøyaktighet. Etter validering ble det funnet at Quattro Premier XE-instrumentet hadde en lekkasje fra vaskeløsningene som ble brukt til vasking av nål før og etter injeksjon. Dette kan ha bidratt til å gi økt variasjon i målinger, og det ble observert toppsplitt i flere kromatogrammer fra analyseserier utført på dette instrumentet.

Det ble benyttet et stort antall standarder ved valideringen for å sikre at MDK og MKK kunne bestemmes nøyaktig.

#### 3.4.1 MDK

MDK ble satt til å være den konsentrasjonen av analytt som gir et S/N på tre eller høyere med en definert kromatografisk topp. Standarder i stigende konsentrasjoner (tabell 24 og 25 i kapittel 6.2.3 i appendiks) ble fortynnet på tilsvarende måte som prøvene (1+1,5 med IS og 0,225 M FA), analysert og S/N i tre løsningsreplikater ble bestemt ved bruk av programvaren. Bestemt MDK, og masse analytt injisert på kolonnen er gitt i tabell 16.

Tabell 16: MDK for analyttene samt tilsvarende mengde analytt injisert på kolonnen.

Analytt	MDK (nM)	MDK (ng/mL)	MDK (nmol/g hjernevev)	MDK (µg/g hjernevev)	Injisert på kolonnen (pg)
5-HT	0,75	0,13	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$6,6 \cdot 10^{-3}$	0,40
5-HIAA	7,1	1,4	$3,6 \cdot 10^{-2}$	$6,8 \cdot 10^{-2}$	4,1
DA	0,75	0,11	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$5,7 \cdot 10^{-3}$	0,34
3-MT	0,75	0,15	$3,8 \cdot 10^{-3}$	$7,6 \cdot 10^{-3}$	0,46
HVA	$4,0 \cdot 10^2$	73	2,0	3,6	$2,2 \cdot 10^2$
DOPAC	$1,0 \cdot 10^2$	17	0,50	0,84	50
NE	6,1	1,0	$3,0 \cdot 10^{-2}$	$5,2 \cdot 10^{-2}$	3,1
ACh	1,5	0,22	$7,5 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	0,66
Glu	2,5	0,4	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,8 \cdot 10^{-2}$	1,1
GABA	5,0	0,5	$2,5 \cdot 10^{-2}$	$2,6 \cdot 10^{-2}$	1,5



MDK var lav nok til å detektere 5-HT, 5-HIAA, Glu, GABA, ACh, DA, 3-MT og DOPAC, i alle hjerneområder og NE i DS. Konsentrasjonene av HVA i hjernevev var for lave til å detekteres med metoden.

MDK for HVA og DOPAC var høye sammenlignet med de andre forbindelsene. HVA og DOPAC har overganger i negativ modus og det var ved bestemmelse av MS-overganger blitt observert at disse ga svært lavt signal sammenlignet med de andre stoffene selv ved høye konsentrasjoner, noe som vil gi en høy MDK. De instrumentelle utfordringene omtalt i kapittel 3.4 kan også ha gitt høyere MDK. Høyere MDK for HVA og DOPAC sammenlignet med 5-HT, 5-HIAA og DA ble også rapportert i LC-MS/MS metoden utviklet av Uutela *et al.* (2009). Her ble også HVA og DOPAC detektert i negativ modus.

MDK var lavere for Glu, GABA, 5-HT og DA enn i UHPLC-MS/MS metoden utviklet av González *et al.* (2011) for bestemmelse av neurotransmittere i hjernevev fra rotte. MDK for 5-HIAA i vår utviklede metode var også like lav som i deres optimaliserte metode. Deteksjonsgrensen for ACh, DOPAC, HVA og GABA er imidlertid høyere i metoden utviklet her, men metoden deres mangler NE og 3-MT.

### 3.4.2 MKK

MKK ble bestemt med ni standarder (se tabell 25 i kapittel 6.2.3 i appediks for konsentrasjon) i tre replikater tillaget i 25 mM FA og fortynnet på tilsvarende måte som prøvene (1+1,5 med IS og 0,225 M FA) og analysert i fem analyseserier på to ulike instrumenter på ulike dager. Prøvene med lavest konsentrasjon hadde en konsentrasjon rundt MKK tidligere antatt ved analyse av standarder. Kravet for MKK var tilsvarende som ved validering av mikrodialysemetoden. RSD skulle være under 20 % og bias skulle være innen intervallet 80-120%. MKK bestemt for analyttene er gitt i tabell 17. MKK ble også konvertert til gram analytt/gram hjernevev for å kunne relatere med basalnivå gitt i g/g hjernevev og mol/g hjernevev (tabell 3 i kapittel 1.5).

Tabell 17: MKK for analyttene bestemt ved analyse av ni standarder over fem analyseserier samt tilsvarende masse analytt injisert på kolonnen, gjennomsnittlig konsentrasjon og usikkerhet for målingene.

Analytt	MKK (nM)	MKK (ng/mL)	MKK (nmol/g hjernevev)	MKK (µg/g hjernevev)	Injisert på kolonnen (pg)	Gj.sn (nM)	n	RSD (%)	Bias (%)
5-HT	6,0	1,1	0,03	0,05	3,1	5,3	14	19	88
5-HIAA	20	3,8	0,10	0,19	11	17	14	19	86
DA	20	3,1	0,10	0,15	9,2	18	15	10	90
3-MT <sup>a</sup>	20	4,1	0,10	0,20	12	20	12	9,4	98
HVA <sup>b</sup>	5,0*10 <sup>2</sup>	91	2,5	4,6	2,7*10 <sup>2</sup>	-	12	-	-
DOPAC	1,0*10 <sup>3</sup>	1,7*10 <sup>2</sup>	5,0	8,4	5,0*10 <sup>2</sup>	8,0*10 <sup>2</sup>	15	20	80
NE	49	8,3	0,25	0,41	25	46	14	16	93
ACh	20	2,9	0,10	0,15	8,8	20	14	18	99
Glu	30	4,3	0,15	0,22	13	24	15	19	82
GABA	15	1,6	0,08	0,08	4,6	14	14	16	95

<sup>b</sup> Ble bestemt som konsentrasjon hvor S/N var 10 eller høyere fordi RSD og bias ikke var innenfor den fastsatte grensen for noen av konsentrasjonsnivåene. <sup>a</sup> 3-MT var ikke lagt inn i MS-filen i den ene analyseserien, og ble kun analysert over 4 analyseserier

Ved sammenligning av MKK med verdiene i tabell 3 i kapittel 1.5 kan det observeres at MKK for flere av forbindelsene er for høye til å kunne detekteres i hjernevev. Kvantifiseringsgrensen for HVA og DOPAC er spesielt høye, som sannsynligvis skyldes grunner nevnt i foregående kapittel. MKK for 5-HT, 5-HIAA, ACh, Glu og GABA er imidlertid lav nok til at neurotransmittere skal kunne detekteres i alle hjerneområder. NE kan måles i helhjernehomogenat og DA kan måles i DS og NAc. De instrumentelle utfordringene nevnt i kapittel 3.4 kan ha bidratt ytterligere til variasjon i målingene og økt MKK.

### 3.4.3 Linearitet

For å undersøke linearitet ble en rekke standarder i 25 mM FA med konsentrasjoner som gitt i tabell 24 i kapittel 6.2.3 i appendiks tilsatt IS, fortynnet med 0,225 mM FA og analysert i seks løsningsreplikater i løpet av samme analyseserie og dag. Kurver ble konstruert på tilsvarende måte som i kapittel 3.3.3, og med samme krav for akseptabel linearitet. Lineariteten for neurotransmitterne og metabolittene er gitt i tabell 18.

Alle analyttene viste linearitet innen kravet på  $R^2 \geq 0,99$  med unntak av HVA og DOPAC. HVA og DOPAC har overganger i negativ modus og det var tidligere blitt observert at disse ga svært lavt signal selv ved høye konsentrasjoner. Dette gjenspeiles av MDK og MKK for forbindelsene. Det ville da være sannsynlig at det var stor variasjon i målingene selv ved analyse av standardene med de høyeste konsentrasjonene.

Tabell 18: Lineært område, korrelasjonskoeffisient og maksimalt residual for analyttene.

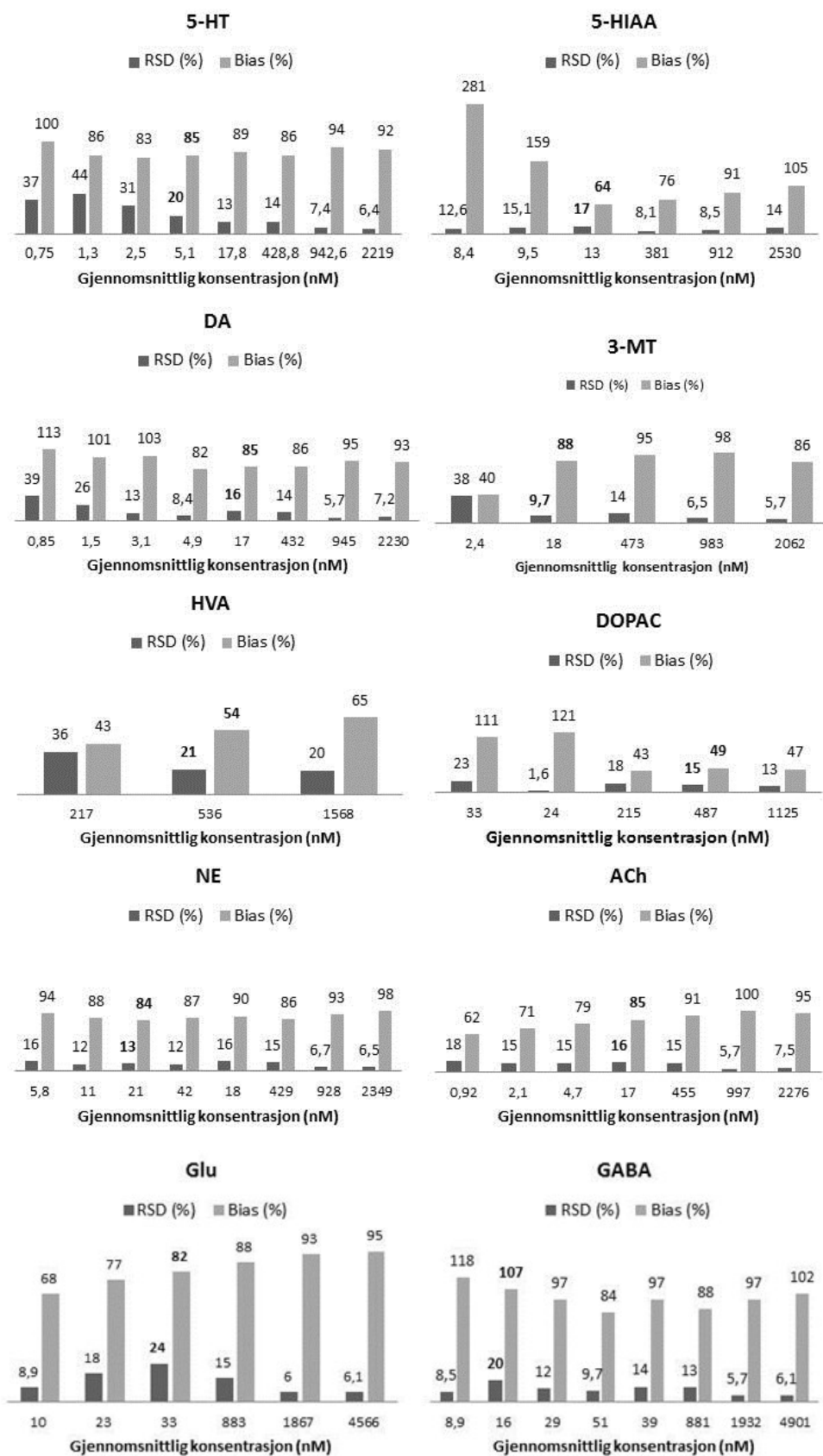
Analytt	Lineært område	R <sup>2</sup>	Residual (%)
5-HT	10-3000	0,9937	19
5-HIAA	100-3000	0,9951	14
DA	25-3000	0,9952	18
HVA	800-3000	0,8704	47
DOPAC	800-3000	0,9883	13
NE	100-3000	0,9943	16
ACH	10-3000	0,9900	18
Glu	35-6000	0,9948	16
GABA	15-6000	0,9965	16
3-MT	25-3000	0,9924	18

Det bør utføres flere forsøk for å undersøke om det er mulig å finne andre MRM-overganger, for HVA og DOPAC som gir høyere signal. Eventuelt kan annen instrumentering som gir bedre signal for negative ioner undersøkes. Den laveste konsentrasjonen i det lineære området for flere av forbindelsene var mye høyere enn MKK. De instrumentelle utfordringene nevnt i kapittel 3.4 kan ha påvirket målingene og ført til større variasjon. Linearitetsforsøket bør av denne grunn utføres på nytt for å undersøke om det lineære området kan økes.

### 3.4.4 Repeterbarhet og nøyaktighet

For å bestemme repeterbarhet ble standardløsning 13-21 (konsentrasjoner gitt i tabell 25 i kapittel 6.2.3 i appendiks) tilsatt FA og IS i tilsvarende volum som ved prøveopparbeiding og analysert i ti løsningsreplikater i løpet av samme dag i samme serie. Repeterbarhet og nøyaktighet ble bestemt på tilsvarende måte som for mikrodialysat beskrevet i kapittel 3.3.5. Kravet for akseptabel presisjon og nøyaktighet ble satt til  $\pm 20\%$  og innenfor 80-120 % ved konsentrasjoner lik eller høyere enn MKK. Presisjon og nøyaktighet innen serie er vist i figur 45, beregninger og statistikk er gitt i tabell 52 i kapittel 6.5.1 i appendiks.

RSD og bias var innenfor kravet for akseptabel presisjon for alle forbindelser med unntak av syrene 5-HIAA, HVA og DOPAC. Grunnen til at HVA viser avvik er mest sannsynlig at forbindelsen gir svært lavt signal selv ved høye konsentrasjoner. Det kan utelukkes at den lave bias verdien til 5-HIAA, DOPAC og HVA skyldes tillagningsfeil fordi de samme løsningene ble brukt i alle valideringsforsøkene, og det ble ikke observert store avvik for de andre forbindelsene eller ved bestemmelse av MKK. Repeterbarhetsforsøket bør utføres på nytt for å se om variasjonen kan skyldes instrumentell svikt og ikke er reell.

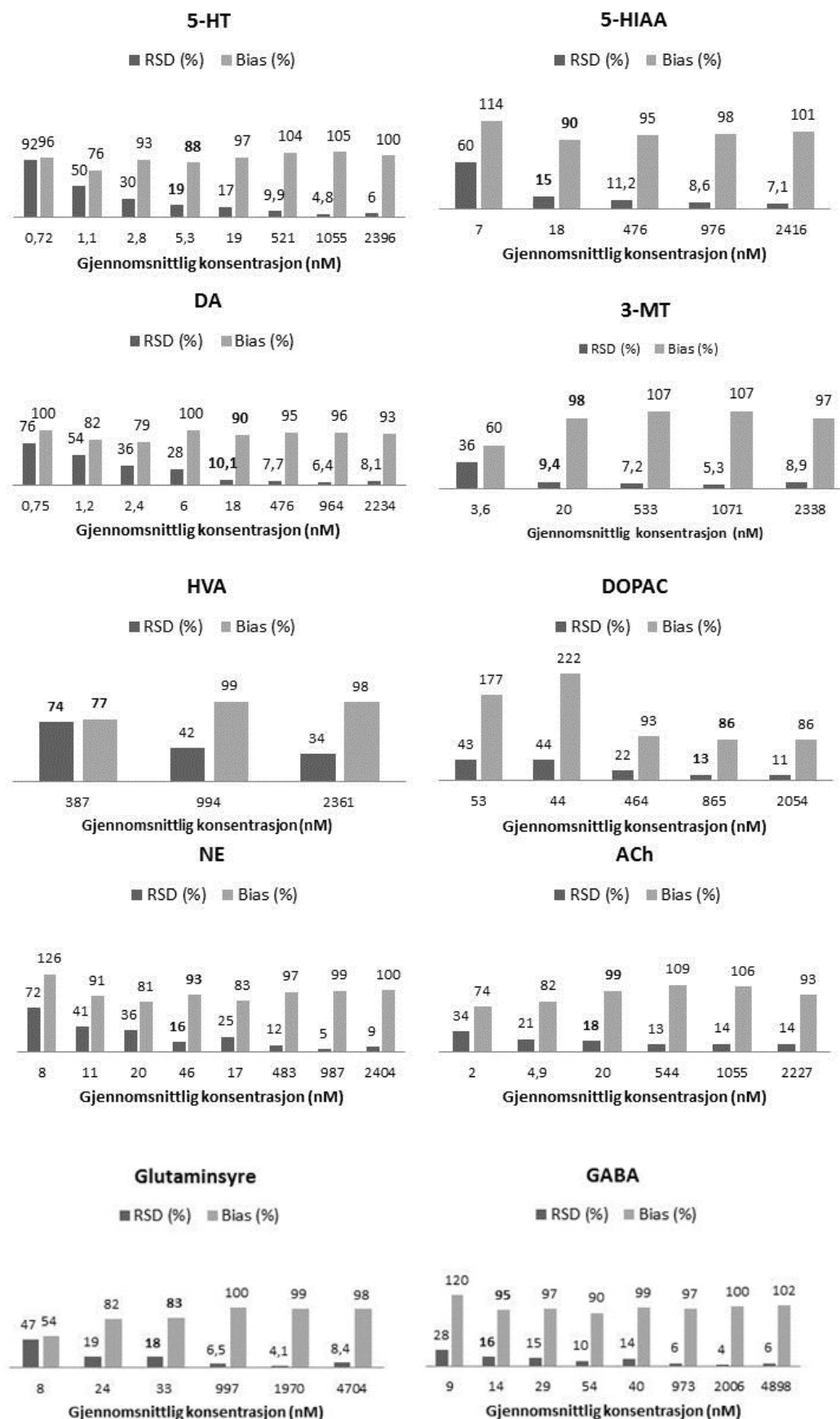


Figur 45: Repeterbarhet og nøyaktighet bestemt ved analyse av ti løsningsreplikater av ni standardløsninger. MKK er markert med fet skrift.

### **3.4.5 Intermediær presisjon og nøyaktighet**

Intermediær presisjon og nøyaktighet ble bestemt ved analyse av tre løsningsreplikater ved ni konsentrasjonsnivåer (tabell 25 i kapittel 6.2.3 i appendiks) over fem analyseserier utført på fem ulike dager og på to ulike instrumenter. Kriteriet for akseptabel presisjon og nøyaktighet er definert i kapittel 3.3.5. Som nevnt i kapittel 3.4.4 var det av ukjent årsak et avvik i biasverdi for 5-HIAA, DOPAC og HVA ved undersøkelse av repeterbarhet, og dette forsøket bør utføres på nytt. Målinger fra dette forsøket ble derfor ikke tatt med ved beregning av intermediær presisjon for HVA, DOPAC og 5-HIAA (n=4). Intermediær presisjon og nøyaktighet er vist i figur 46, og statistikk og beregninger gitt i tabell 53 i kapittel 6.5.2 i appendiks.

Alle forbindelser med unntak av HVA har akseptabel intermediær presisjon og nøyaktighet. Avviket til HVA skyldes mest sannsynlig grunnene nevnt i kapittel 3.4.4.



Figur 46: Intermediær presisjon og nøyaktighet bestemt ved analyse av ni standarder i tre løsningsreplikater over fem analyseserier. Resultater hvor kvantifisering ga 0 nM er ikke gitt i figuren. \*n=4 for DOPAC, 5-HIAA og HVA.

### **3.4.6 Konklusjoner fra validering og videre arbeid**

Alle analytter besto kravene for godkjent validering med unntak av DOPAC, HVA og 5-HIAA. MKK var lav nok til å detektere 5-HT, 5-HIAA, ACh, Glu og GABA ved basalnivå i alle hjerneområder. NE kunne måles i helhjerne og DA kan måles i DS og NAc.

Valideringen ble utført på to ulike instrumenter med ulik følsomhet. Dette har sannsynligvis bidratt til å gi økt variasjon i målingene. Dersom det mest følsomme instrumentet var blitt brukt under hele valideringsprosessen ville metodens MDK og MKK etter all sannsynlighet blitt lavere. Det ble også oppdaget en lekkasje i instrumentet etter at valideringen var blitt utført og det ble observert at dette hadde påvirket toppformen i enkelte av kromatogrammene. Dette kan ha bidratt til økt variasjon i målingene. I det videre arbeidet bør repeterbarhetsforsøket utføres på nytt og flere serier analyseres for bestemmelse av intermediær presisjon. Matrikseffekter fra forbindelser i hjernevev bør også undersøkes.

Valideringen ga akseptable resultater for majoriteten av neurotransmitterne, og det er derfor mulig å måle flertallet av analyttene i hjernevev. Det ville derfor være av interesse å analysere flere reelle prøver med metoden.

## **3.5 Analyse av reelle prøver**

Reelle prøver fra mikrodialyse utført på en rotte eksponert for den aktive heroinmetabolitten 6-MAM og hjernevevsprøver fra mus injisert med heroin ble analysert med de utviklede og validerte metodene.

### **3.5.1 Analyse av mikrodialysatprøver**

Mikrodialyse ble utført på en rotte med mikrodialyseprober i VTA og NAc. Proben i VTA ble perfundert med den aktive heroinmetabolitten 6-MAM. Mikrodialyseproben i NAc ble kun perfundert med Ringers løsning, men det er kjent at nevroner strekker seg fra VTA til NAc. Mikrodialyseprøvene ble samlet opp både før proben ble perfundert med 6-MAM (basalnivå) og under 6-MAM-eksponeringen. Forsøket ble utført for å undersøke om neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter kunne bestemmes i reelle prøver med metoden validert i kapittel 3.3, samt undersøke om nivåene av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter endret seg ved eksponering for 6-MAM. Tidligere studier

utført ved FHI har vist økning av DA i NAc ved intravenøs injeksjon med 6-MAM (Gottås et al. 2014). I dette forsøket ble 6-MAM administrert direkte i hjerneområdet VTA for å undersøke om dopaminnivåene ble påvirket på tilsvarende måte som etter intravenøs injeksjon.

Ved prøvetakningen ble seks prøver av basalnivå oppsamlet før perfundering av VTA med 6-MAM. Ved beregning av gjennomsnitt ble de fire siste basalprøvene tatt med fordi tidligere forsøk har vist at de to første basalprøvene er gjennomgående høyere enn i de påfølgende basalprøvene. Fordi basalnivå kan variere svært mye mellom dyr ble gjennomsnittlig basalnivå trukket fra konsentrasjonene målt etter eksponering med 6-MAM. Punktdiagrammer som viste konsentrasjon av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter i VTA og NAc over tid relativt til basalnivå er vist i figur 47 og 48. Konsentrasjonene i alle prøvene er gitt i tabell 54 og 55 i kapittel 6.6.1 i appendiks.

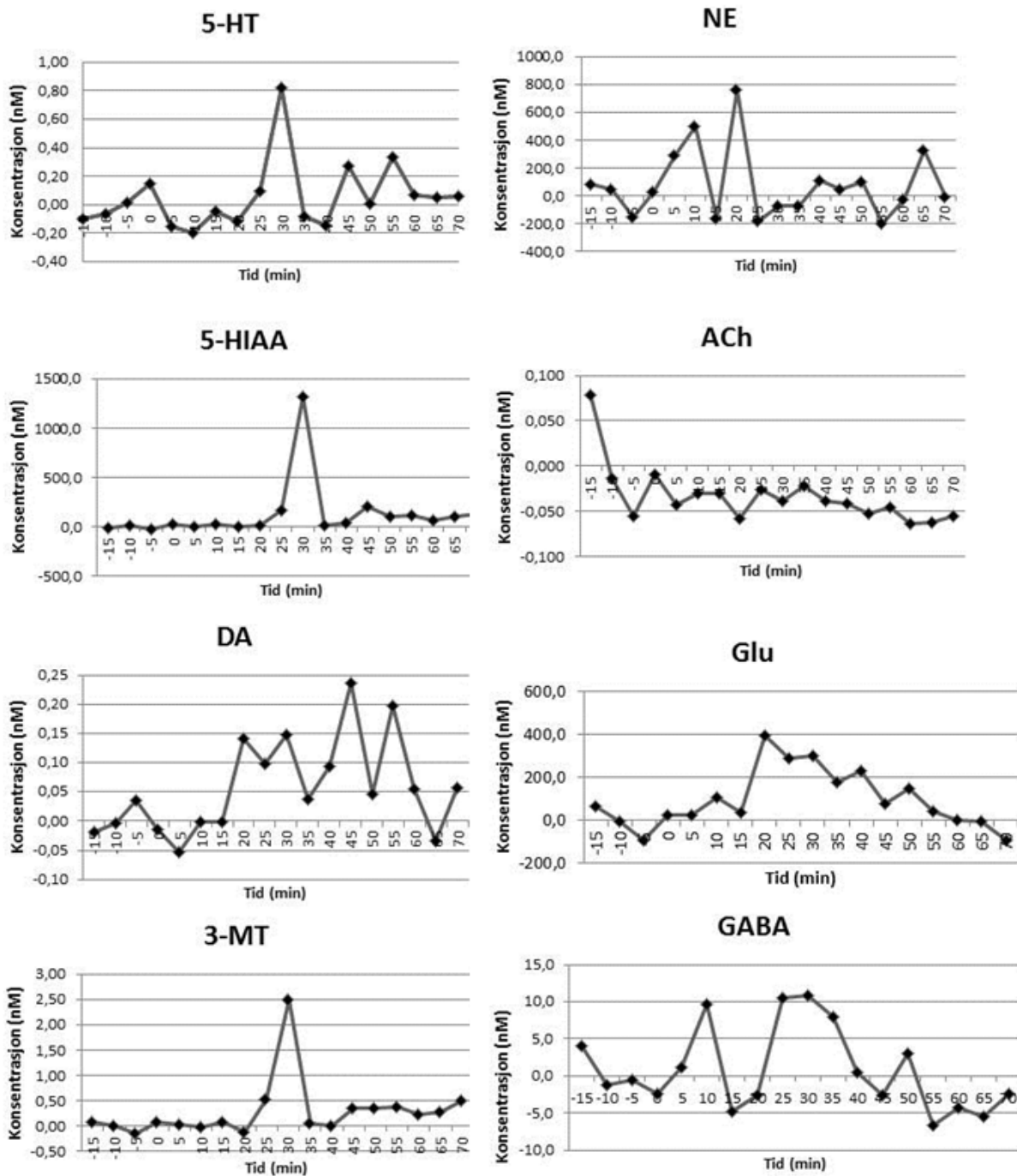
Nivåene av 5-HT og 5-HIAA i VTA økte etter eksponering av 6-MAM og økningen kom til syne etter 30 min. Tilsvarende økning kunne observeres i NAc, men økningen forekommer etter 5 min. Økning av 5-HIAA etter heroineksponering av rotter ble vist i en studie utført av Harleem *et al.* (1994), men økningen i både 5-HT- og 5-HIAA-nivå etter heroin injeksjon har kun blitt vist en gang tidligere i en studie utført av Pérez-Cruet *et al.* (1975) hvor rotter ble injisert med heroin, avlivet og nivåer målt i hjernevev. Det har ikke blitt gjort studier på hvordan 6-MAM påvirker nivåene av 5-HT og 5-HIAA. Dette er derfor et funn som bør undersøkes videre ved å utføre mikrodialyse på flere dyr, med både eksperiment med 6-MAM og kontroller (NaCl) for å eliminere effekten av injeksjon alene. En fordel med mikrodialyseteknikken sammenlignet med teknikken brukt av Pérez-Cruet *et al.* er at 5-HIAA og 5-HT-nivåene studeres over et tidsrom.

Konsentrasjonen av Glu øker i VTA etter administrasjon av 6-MAM, men ingen effekt observeres i NAc. Økningen av Glu i VTA kan imidlertid være en respons på skade i vevet og frigjøring av Glu fra gliaceller. Det var forventet at konsentrasjonen av GABA skulle reduseres ettersom opiat er kjent for å hemme GABA-frigjøring (Nestler 2005). GABA-konsentrasjonen viste en tendens til reduksjon, men var lavere enn MKK med store svingninger og konklusjoner kan ikke trekkes fra målingene som ble utført. I NAc var det ingen tydelig økning eller nedgang av GABA-konsentrasjonen. Konsentrasjonen av DA og 3-MT viste en tendens til økning i VTA etter eksponering av 6-MAM. Tilsvarende trender for DA

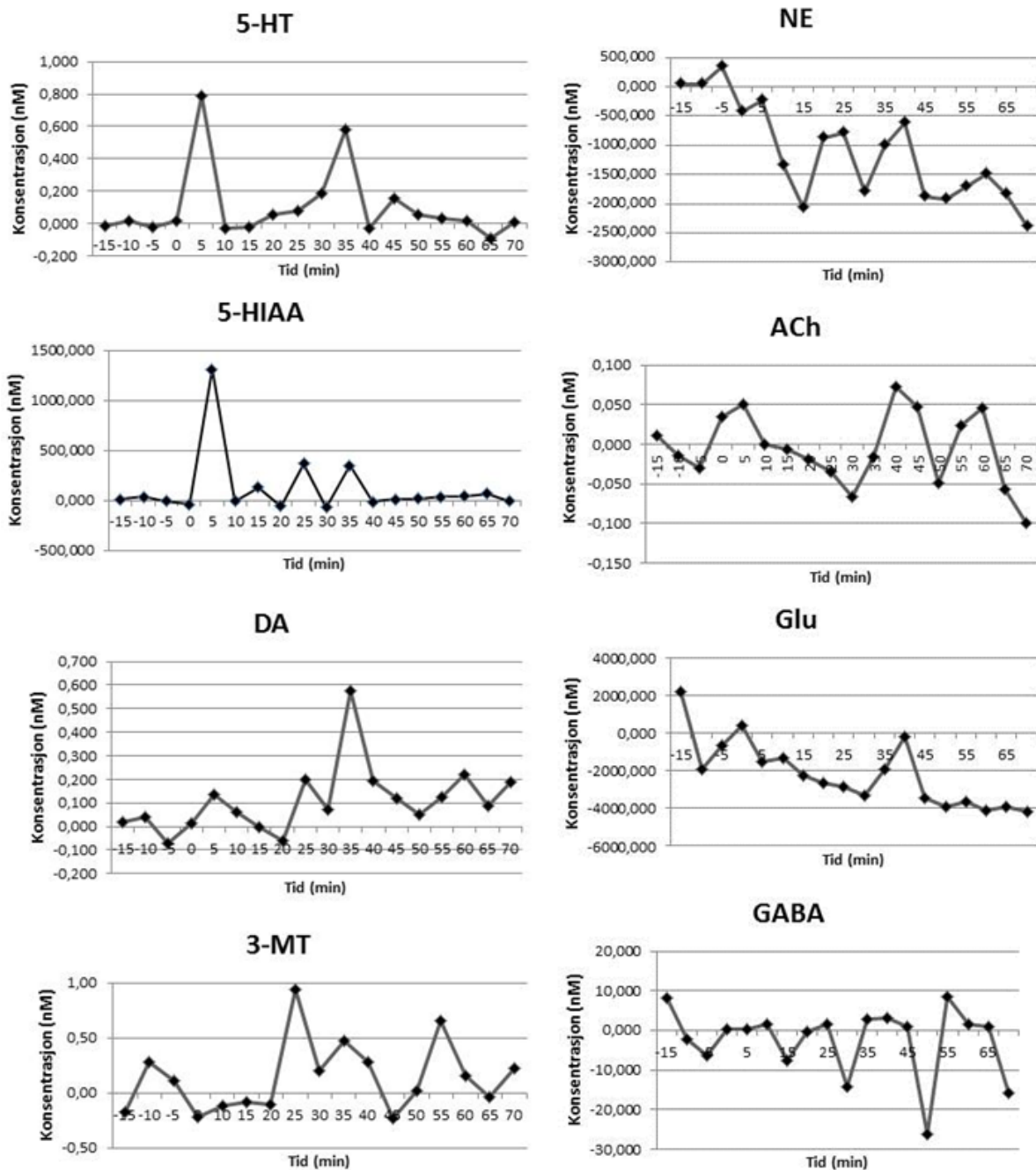


og 3-MT ble også observert i NAc. I flere av prøvene var imidlertid konsentrasjonen av 3-MT og DA lavere enn MKK. Resultatene fra ett enkeltdyr er beheftet med usikkerhet og gir kanskje ikke et helt korrekt bilde av endringene av neurotransmittere, men som nevnt tidligere i kapitlet har forskning ved FHI vist at konsentrasjonen av DA i NAc øker ved eksponering for 6-MAM. Det er derfor sannsynlig at den observerte tendensen til økning av DA-nivå er reell. Det ble ikke observert endringer i ACh- og NE-nivå i VTA og NAc etter 6-MAM-eksponering.

Konklusjonen er at metoden kan brukes til å bestemme 5-HIAA, 5-HT og Glu i ECV fra VTA og NAc, og i tillegg kan GABA-konsentrasjonen måles i ECV fra VTA. Grunnen til at alle neurotransmitterne ikke kunne måles kan også skyldes at de ikke forekommer i de undersøkte hjernedelene. Effektene av 6-MAM på 5-HIAA, 5-HT, Glu og GABA (i VTA) bør undersøkes nærmere ved mikrodialyse av flere rotter eksponert for 6-MAM for å se om effekten er reell eller skyldes tilfeldig variasjon i prøveinnsamling. DA og 3-MT kunne detekteres, men grunnet lave konsentrasjoner under MKK kan de ikke kvantifiseres nøyaktig i flere av prøvene. Økning av DA etter eksponering med 6-MAM er imidlertid blitt vist tidligere ved FHI, og det er sannsynlig at den observerte trenden er reell. Det kan undersøkes om retensjonen av DA kan økes ved bruk av eksempelvis ioneparingsreagenser tilpasset MS, slik at ME for DA, ACh, GABA, Glu og NE blir mindre og MKK lavere. Nivåene av NE og ACh viste ingen tegn til økning eller nedgang etter perfusjon med 6-MAM i VTA.



Figur 47: Endringen av neurotransmitter- og metabolittkonsentrasjon ved eksponering for 6-MAM i VTA over tid relativt til basalnivå. 6-MAM ble tilsatt ved t= 0 og målinger før dette er basalnivå.



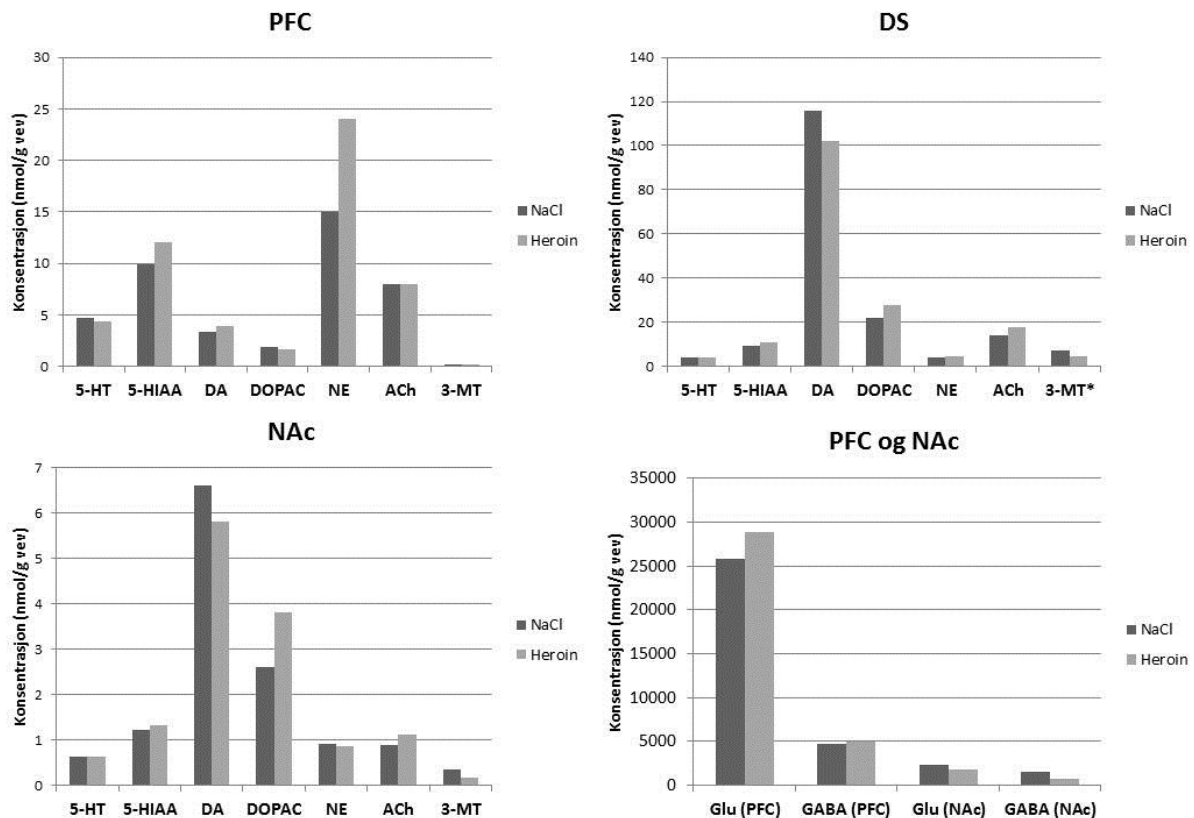
Figur 48: Endringen av neurotransmitter- og metabolittkonsentrasjon ved eksponering for 6-MAM i NAC over tid relativt til basalnivå. 6-MAM ble tilsatt ved t= 0 og målinger før dette er basalnivå.

### 3.5.2 Analyse av hjernevevsprøver

Mus ble eksponert for henholdsvis heroin (n=7) og NaCl (n=7) (kontrollgruppe), og overført til et lokosjonskammer hvor løpsaktivitet ble målt de første 20 min etter injeksjon (figur 54 i kapittel 6.6.2. i appendiks). Løpsaktivitet viser om rusmidlet har hatt en effekt. Deretter

ble musene avlivet og hjernen tatt ut og PFC, NAc og DS dissekert. Hjernedelene ble homogenisert og felt med FA før analyse. Fordi NAc er et svært lite hjerneområde (< 3 mg i mus ) måtte NAc homogeniseres til en lavere konsentrasjon enn PFC og DS. Fra studiene av ulike fellingsmetoder for hjernehomogenat (kapittel 2.6), ble det konkludert med at konsentrasjonene av enkelte av neurotransmitterne kunne bli under MDK dersom prøven ble fortynnet 2,5 ganger under prøveopparbeidelsen. Fellingen av NAc ble derfor utført med mindre volum 25 mM FA og IS. Ved undersøkelse av ulike fellingsmetoder ble det funnet at prøvene måtte fortynnes før Glu og GABA kunne kvantifiseres. For å undersøke hvor mye prøvene måtte fortynnes samt få en indikasjon på om nivåene av Glu og GABA endret seg ved injeksjon av heroin, ble noen av de proteinfelte prøvene fortynnet 1/1000. Fortynningen medførte at signalet fra IS ikke var målbart og kvantifisering måtte derfor utføres med ekstern standard metode.

Forsøket ble utført for å undersøke om det var mulig å detektere endringer i nivåene av neurotransmitter og neurotransmitter-metabolitt i hjernevev uten å gjøre krevende mikrodialysestudier, samt se hvilken effekt heroineksponeeringen hadde på nivåene av de ulike forbindelsene i hjernevev. Det var også av interesse å sammenligne om målinger i hjernen hos mus eksponert for heroin samsvarte med endringen målt i mikrodialysat fra rotte etter eksponering for heroinmetabolitten 6-MAM. HVA kunne ikke detekteres i noen av prøvene, sannsynligvis fordi MDK var for høy. Konsentrasjoner av neurotransmittere målt i de ulike hjernedelene er vist i figur 49. Konsentrasjoner målt i prøvene, samt statistiske beregninger er gitt i tabell 56-58 i kapittel 6.6.2 i appendiks.



Figur 49: Konsentrasjoner av neurotransmittere funnet i ulike hjernedeler for mus injisert med heroin og NaCl. GABA og Glu konsentrasjonene er gitt i egen figur. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g hjernevev. (\*p < 0,05).

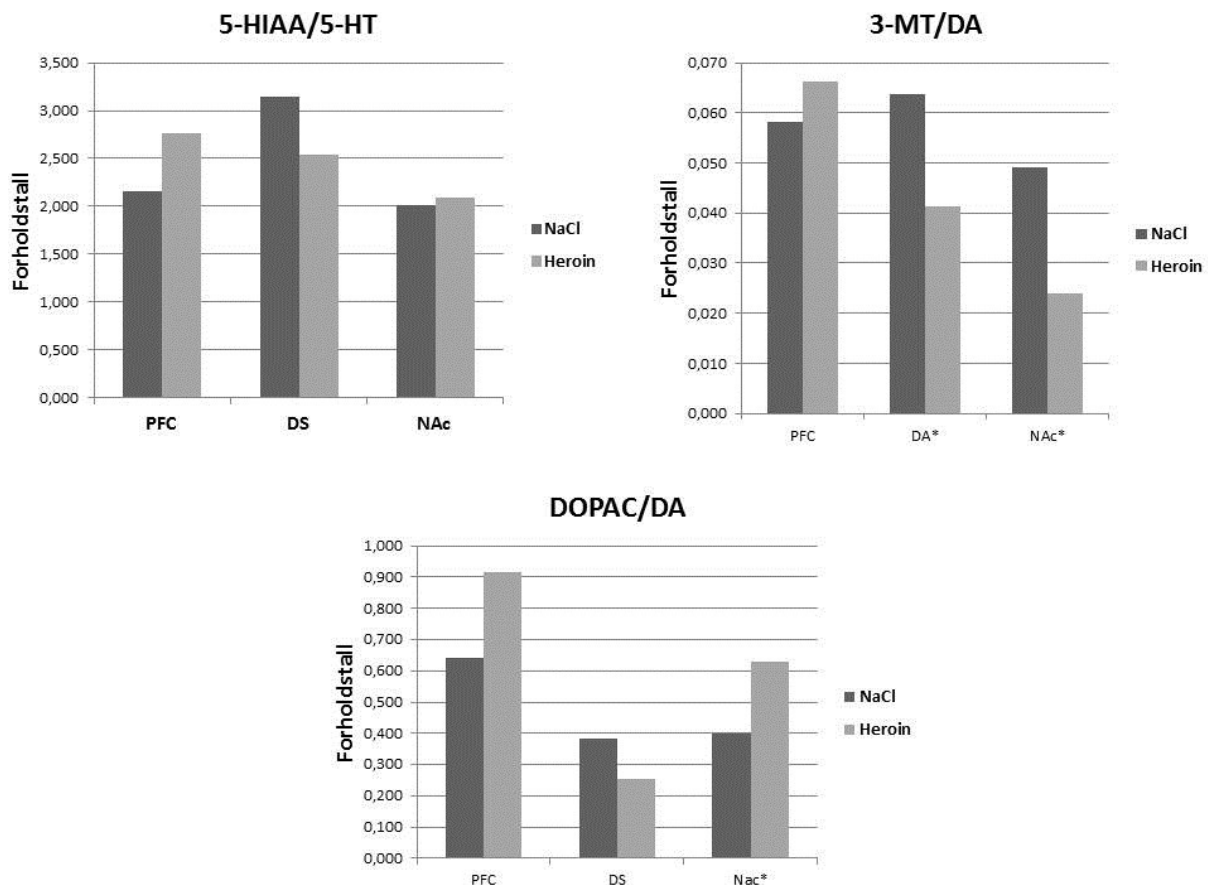
Lokomosjonsdata viser at musene var tydelig påvirket etter heroininjeksjon (figur 54 i kapittel 6.6.2 i appendiks). Det kan fastslås at mengden heroin injisert ga ruseffekt, og eventuelle endringer i neurotransmitternivå kan skyldes effekter fra heroin.

Konsentrasjonene av GABA og Glu ble beregnet ved ekstern standard metode fordi det ikke ble tilsatt nok IS ved prøveopparbeidingen. Verdiene i figuren viser derfor hva konsentrasjonen var i prøvene etter proteinfelling. HVA ble ikke detektert i noen av prøvene. Dette skyldes at MDK er for høy, men som gitt i tabell 3 i kapittel 1.5 ble ikke HVA detektert i PFC og DS. Konsentrasjonen av DOPAC var i noen av prøvene fra NAc og PFC lavere enn MKK, samtidig viste ikke DOPAC linearitet ved valideringen. Konsentrasjonene gitt i figur 49 er derfor estimert mengde.

Det var forventet en økning av dopaminkonsentrasjonen etter injeksjon av heroin, men det er tidligere funnet at dopaminnivået i NAc ikke øker mer enn 1,5-3 ganger relativt til basalnivå etter administrasjon av heroin (Hemby et al. 1995, Wise et al. 1995). Fordi forventet endring er så liten var det en sannsynlighet for at signifikante forskjeller ikke ville observeres fordi basalnivå kan variere mye mellom individer, og endring i dopaminnivå ville

kunne være ulikt mellom dyr. Det ble utført t-test for å undersøke om konsentrasjonene målt i hjernevev fra mus som hadde fått injeksjon av heroin var signifikant forskjellig fra kontroll. Det ble funnet at kun konsentrasjonen av 3-MT i DS var signifikant ulik etter injeksjon med heroin. Det kan observeres fra figur 49 at gjennomsnittlig konsentrasjon av 3-M ble redusert med 40 % hos dyr eksponert for heroin. Lignende observasjoner er gjort av Desole *et al.*, hvor rotter ble injisert med morfin (1996). Her ble det funnet at konsentrasjonen av 3-MT ble redusert med 57 % i striatum etter én injeksjon med morfin. Morfin er et nedbrytningsprodukt av heroin, og funn indikerer at heroin i seg selv er inaktivt, og at selve effektene kommer av metabolittene 6-MAM og morfin (Boix et al. 2013). Det kan da være en sannsynlighet for at 3-MT konsentrasjonen reduseres som følge av effektene fra metabolitten morfin, men nedgangen kan også skyldes 6-MAM. En delvis revalidering av metoden etterfulgt av flere forsøk og kontrollforsøk bør utføres for kunne si med sikkerhet at den observerte effekten skyldes opiateksponeringen og ikke tilfeldig variasjon.

En utfordring med å måle neurotransmitterkonsentrasjoner i hjernevev sammenlignet med mikrodialysat er at det ikke kan korrigeres for forskjeller i basalnivå. Dette kan forklare hvorfor det ikke var mulig å finne en endring i eksempelvis DA-nivå i NAc etter heroininjeksjon. Forholdstallet mellom neurotransmitter og metabolitt kan være et bedre mål. Siden konsentrasjonene kun måles ved ett tidspunkt vil forholdstall av neurotransmittere og metabolitter gi mer informasjon om neurotransmitterfrigjøring over et lengre tidsrom. Forholdstallet mellom 5-HT og 5-HIAA, og mellom DA og DOPAC og 3-MT ved injeksjon av NaCl og heroin ble beregnet for å undersøke neurotransmitter-metabolismen var forskjellig i mus eksponert for heroin sammenlignet med kontroll. Forholdstallene er vist i figur 50 og statistiske beregninger er gitt i tabell 59 i appendiks.



Figur 50: Forholdstallene mellom neurotransmitter og metabolitt i ulike hjernerdelene ved injeksjon av NaCl og heroin. (\*  $p < 0,05$ )

For å undersøke om forholdstallet mellom neurotransmittere og metabolitter ved injeksjon av hhv. natriumklorid og heroin var signifikant forskjellige ble t-test utført. Det ble funnet at forholdstallet mellom 3-MT og DA i NAc og DS, samt forholdstallet mellom DOPAC og DA var signifikant forskjellig mellom heroineksponte og kontrolldyr. Forholdstallet mellom DOPAC og DA i NAc økte med 59 %, men ettersom konsentrasjonen av DOPAC er beheftet med usikkerhet må dette resultatet kun betraktes som en indikasjon. Målingene i NAc viser også et høyt RSD ( $\approx 50\%$ ). DA viste en tendens til å degraderes til DOPAC i større grad etter injeksjon av heroin, slik at mengden DOPAC økte. Dette er i samsvar med en tidligere studie hvor administrasjon av heroin har blitt funnet til å øke konsentrasjonen av DOPAC i NAc hos rotter (Wise et al. 1995). Det er da en sannsynlighet for den at den observerte tendensen til økning i DOPAC/DA forholdstallet er reell. Forholdstallet mellom 3-MT og DA var redusert med 51 % i NAc og 35 % i DS, som antyder at DA degraderes til 3-MT i mindre grad etter injeksjon av heroin. RSD i målingene gjort i NAc er imidlertid svært høyt ( $\approx 50\%$ ), og beregnet forholdstall i dette hjerneområdet kan kun betraktes som en indikasjon. Det ble også brukt

andre fortynningsfaktorer ved prøveopparbeidelse av NAc enn i den validerte metoden for å øke konsentrasjonen av neurotransmittere i prøvene. Metoden er ikke validert for disse betingelsene, og resultatene herfra kan kun benyttes som en indikasjon.

Det kan konkluderes med at metoden kan brukes til å kvantifisere alle neurotransmitterne og metabolittene i hjernevev, med unntak av HVA og DOPAC. Det bør også undersøkes hvor mye prøvene må fortynnes for å kunne kvantifisere Glu og GABA, og om fortynningen har noen effekt på kromatografien. En mer konsentrert IS for Glu og GABA bør tilsettes før fortynning av prøve slik at tap av analytt under prøveopparbeidingen korrigeres for ved kvantifisering. NAc måtte opparbeides på en annen måte enn i den validerte metoden, og prøveopparbeidingsmetoden videreutvikles for analyse av NAc. Interessante tendenser til endring av 3-MT-nivå, og metabolitt/neurotransmitter-forholdstall ble funnet og skal studeres videre i flere forsøk.



## 4. KONKLUSJON

For å utvikle en UPLC-MS/MS metode for kvantitativ bestemmelse av 5-HT, 5-HIAA, NE, ACh, Glu, GABA, DA, 3-MT, DOPAC og HVA i mikrodialysat ble ulike kromatografiske separasjonsprinsipper, kolonner og mobilfaser undersøkt. Best resultater ble oppnådd ved separasjon på en Acquity UPLC HSS T3 kolonne (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,8 µm) med gradienteluering med en mobilfase bestående av 25 mM FA og MeOH. Av instrumentelle årsaker kunne ikke DOPAC og HVA måles og ble fjernet fra metoden. Metoden ble validert, og ga resultater innenfor de fastsatte kravene for alle analytter med unntak av NE og GABA (repetierbarhet). Repetierbarhet for GABA bør undersøkes på nytt ettersom intermediær presisjon ikke avviker for forbindelsen. En signifikant matrikseffekt påvirket kvantifisering av ACh, Glu og NE, og IS for 3-MT var ikke optimal og ga høyere matrikseffekter etter korrigering. I det videre arbeidet bør det derfor anskaffes isotopmerkede IS for alle forbindelsene.. Det kan også undersøkes om et MS-kompatibelt ioneparingsreagens kan gi økt retensjon av ACh, Glu, GABA og NE. HILIC ble undersøkt og ga lovende resultater for utvikling av en egen separasjonsmetode for NE, Glu og GABA i mikrodialysat.

Reelle prøver fra rotter eksponert for heroinmetabolitten 6-MAM ble analysert med UPLC-MS/MS -metoden, og det ble funnet at metoden kan brukes til å bestemme 5-HT, 5-HIAA, Glu og GABA i ECV fra VTA og NAc. DA og 3-MT kunne detekteres, men krever oppkonsentrering av prøvene for å kunne kvantifiseres nøyaktig. NE ble detektert, men tiltak som kan øke retensjonsfaktor eller anskaffelse av isotopmerket IS må utføres før neurotransmitteren kan kvantifiseres nøyaktig. ACh forekommer trolig i for lave konsentrasjoner i de undersøkte hjerneområdene til å kunne kvantifiseres med den utviklede metoden. De analyserte prøvene viste en interessant økning av 5-HT og 5-HIAA etter 6-MAM eksponering. Oss bekjent har kun én tidligere publisering vist økningen av 5-HIAA og 5-HT og da etter heroineksponering. Effekten som følge av 6-MAM eksponering er ikke blitt vist tidligere og det er ønskelig å studere dette i videre arbeid.

En UPLC-MS/MS metode for bestemmelse av 5-HT, 5-HIAA, NE, ACh, Glu, GABA, DA, 3-MT, DOPAC og HVA i hjernevev ble utviklet og delvis validert. Det kromatografiske systemet var tilsvarende metoden utviklet for mikrodialysat, men med en lengre gradientprofil. Ulike proteinfellingsmetoder for hjernevev ble undersøkt og en enkel og rask fellingsmetode med

FA ble valgt. Grunnet instrumentelle utfordringer bør enkelte av valideringsparameterne undersøkes på nytt. MKK for metoden var lav nok til å kvantifisere 5-HT, 5-HIAA, ACh, Glu og GABA ved basalnivå i alle hjerneområder. DA kunne bestemmes i DS og NAc og NE kunne bestemmes i homogenat fra helhjerne. Reelle hjernevevsprøver fra PFC, NAc og DS hos mus eksponert for heroin og NaCl ble opparbeidet og analysert med den utviklede UPLC-MS/MS-metoden. Det ble funnet at alle neurotransmitterne kunne kvantifiseres i PFC, NAc og DS med unntak av HVA og DOPAC. DOPAC kunne detekteres, men ikke kvantifiseres nøyaktig i alle prøver. Det ble funnet at prøvene måtte fortynnes før kvantifisering av GABA og Glu. Videre metodeutvikling bør utføres for bestemmelse av GABA og Glu, samt for analyse av hjernevev fra NAc. Interessante tendenser til påvirkning av 3-MT nivå og neurotransmitter/metabolitt-forholdstall ble vist og vil bli undersøkt inngående i videre studier ved FHI.

## 5. REFERANSER

Appelblad, P., Jonsson, T., Pontén, E., Viklund, C. og Jiang, W. (2008). A practical guide to HILIC. Umeå, Merck SeQuant AB.

Arsenault, J. C. og McDonald, P. (2007). Beginners guide to liquid chromatography. Milford, Waters Corporation.

Aston-Jones, G., Meijas-Aponte, C. A. og Waterhouse, B. (2009). Norepinephrine: CNS Pathways and Neurophysiology. Encyclopedia of Neuroscience. Oxford, Academic Press: 1237-1248.

Aversano, C. D., Hess, P. og Quilliam, M. A. (2005). "Hydrophilic interaction liquid chromatography–mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins." Journal of Chromatography A **1081**: 190-201.

Bear, M. F., Connors, B. W. og Paradiso, M. A. (2007). Neuroscience: Exploring the brain. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Berg, T., Karlsen, M., Øiestad, Å. M. L., Johansen, J. E., Liu, H. og Strand, D. H. (2014). "Evaluation of <sup>13</sup>C- and <sup>2</sup>H-labeled internal standards for the determination of amphetamines in biological samples, by reversed-phase ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1344**: 83-90.

Bicker, J., Fortuna, A., Alves, G. og Falcão, A. (2013). "Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples—A review." Analytica Chimica Acta **768**: 12-34.

Boddy, R. og Smith, G. (2010). Effective experimentation: For scientists and technologists. Chichester, John Wiley & Sons.

Bogen, I. L., Haug, K. H., Roberg, B., Fonnum, F. og Walaas, S. I. (2009). "The importance of sypsin I and II for neurotransmitter levels and vesicular storage in cholinergic, glutaminergic and GABAergic nerve terminals." Neurochemistry International **55**: 13-21.

Boix, F., Andersen, J. M. og Mørland, J. (2013). "Pharmacokinetic modeling of subcutaneous heroin and its metabolites in blood and brain of mice." Addiction Biology **18**: 1-7.

Bosse, K. E., Birbeck, J. A., Newman, B. D. og Mathews, T. A. (2013). Chapter 20 - Analysis of Neurotransmitters and Their Metabolites by Liquid Chromatography. Liquid Chromatography. Amsterdam, Elsevier: 541-609.

Brodal, P. (2013). Sentralnervesystemet. Oslo, Universitetsforlaget.

Buszewski, B. og Noga, S. (2012). "Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique." Analytical and Bioanalytical Chemistry **402**: 231-247.

Cai, H., Zhu, R. og Li, H. (2010). "Determination of dansylated monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in human plasma by liquid chromatography—electrospray ionization tandem mass spectrometry." Analytical Biochemistry **396**: 103-111.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Taylor, M. R. og Simon, E. J. (2006). Biology : Concepts & connections. San Fransisco, Pearson.

Cavazzini, A. og Felinger, A. (2013). Chapter 5 - Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. Liquid Chromatography. Amsterdam, Elsevier: 105-119.

Chaurasia, C. S., Muller, M., Bashaw, E. D., Benfeldt, E., Bolinder, J., Bullock, R., Bungay, P. M., DeLange, E. C., Derendorf, H., Elmquist, W. F., Hammarlund-Udenaes, M., Joukhadar, C., Kellogg, D. L., Jr., Lunte, C. E., Nordstrom, C. H., Rollema, H., Sawchuk, R. J., Cheung, B. W., Shah, V. P., Stahle, L., Ungerstedt, U., Welty, D. F. og Yeo, H. (2007). "AAPS-FDA workshop white paper: microdialysis principles, application and regulatory perspectives." Pharmaceutical Research **24**: 1014-1025.

Cole, R. B. (1997). Electrospray ionization mass spectrometry. New York, Wiley.

Cooper, J. R. (2001). Neurotransmitters. International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences. Oxford, Pergamon: 10612-10619.

Cooper, J. R., Bloom, F. E. og Roth, R. H. (2003). The biochemical basis of neuropharmacology. Oxford, Oxford university press.

Costa, E. (2004). GABA (Gamma-Aminobutyric Acid). Encyclopedia of Endocrine Diseases. New York, Elsevier: 89-93.

Danaceau, J. P., Chambers, E. E. og Fountain, K. J. (2012). "Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for LC-MS/MS analysis of monoamine neurotransmitters." Bioanalysis **4**: 783-794

Davies, J. A. (2007). Substance abuse agents. xPharm: The comprehensive pharmacology reference. New York, Elsevier: 1-2.

de Hoffmann, E. og Stroobant, V. (2007). Mass Spectrometry: Principles and applications. Chichester, Wiley.

Desole, M. S., Esposito, G., Fresu, L., Migheli, R., Enrico, P., Mura, M. A., Natale, G. D., Miele, E. og Miele, M. (1996). "Effects of morphine treatment and withdrawal on striatal and limbic monoaminergic activity and ascorbic acid oxidation in the rat." Brain Research **723**: 154-161.

Foley, P. (2009). Dopamine in perspective. Encyclopedia of neuroscience. Oxford, Academic Press: 563-570.

Fotopoulou, M. A. og Ioannou, P. C. (2002). "Post-column terbium complexation and sensitized fluorescence detection for the determination of norepinephrine, epinephrine and dopamine using high-performance liquid chromatography." Analytica Chimica Acta **462**: 179-185.

González, R. R., Fernández, R. F., Vidal, J. L. M., Frenich, A. G. og Pérez, M. L. G. (2011). "Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass-spectrometry (UHPLC–MS/MS) method for the simultaneous determination of neurotransmitters in rat brain samples." Journal of Neuroscience Methods **198**: 187-194.

Gottås, A., Boix, F., Oiestad, E. L., Vindenes, V. og Morland, J. (2014). "Role of 6-monoacetylmorphine in the acute release of striatal dopamine induced by intravenous heroin." International Journal of Neuropsychopharmacology: 1-9.

Grace, A. A., Lodge, D. J. og Buffalari, D. M. (2009). Dopamine – CNS pathways and neurophysiology. Encyclopedia of neuroscience. Oxford, Academic Press: 549-555.

Greco, S., Danysz, W., Zivkovic, A., Gross, R. og Stark, H. (2013). "Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters—A versatile and sensitive LC–MS/MS method." Analytica Chimica Acta **771**: 65-72.

Greibrokk, T., Lundanes, E. og Rasmussen, K. E. (2005). Kromatografi: Separasjon og deteksjon. Oslo, Universitetsforlaget.

Gross, J. H. (2011). Mass spectrometry: A textbook. Berlin, Springer.

Grumbach, E. S., Arsenault, J. C. og McCabe, D. R. (2009). Beginners guide to UPLC: Ultra-performance liquid chromatography. Milford, Waters Corporation.

Haleem, D. J., Zafar, A., Azam, S. og Yasmeen, A. (1994). "Tolerance to diacetyl morphine antinociception: effects on brain serotonin." Neuroreport **5**: 781-784.

Hao, Z., Xiao, B. og Weng, N. (2008). "Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography (HILIC)." Journal of Separation Science **31**: 1449-1464.

Hardie, D. G. (1991). Biochemical messengers: Hormones, neurotransmitters and growth factors. London, Chapman & Hall.

Harris, D. C. (2007). Quantitative chemical analysis. New York, Freeman.

Heal, D. J., Frankland, A. T. J. og Buckett, W. R. (1990). "A new and highly sensitive method for measuring 3-methoxytyramine using HPLC with electrochemical detection. Studies with drugs which alter dopamine metabolism in the brain." Neuropharmacology **29**: 1141-1150.

Hemby, S. E., Martin, T. J., Co, C., Dworkin, S. I. og Smith, J. E. (1995). "The effects of intravenous heroin administration on extracellular nucleus accumbens dopamine concentrations as determined by in vivo microdialysis." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **273**: 591-598.

Hyman, S. E. (2005a). "Addiction: a disease of learning and memory." The American Journal of Psychiatry **162**: 1414-1422.

Hyman, S. E. (2005b). "Neurotransmitters." Current Biology **15**: R154-R158.

Johnsen, E., Wilson, S. R., Odsbu, I., Krapp, A., Malerod, H., Skarstad, K. og Lundanes, E. (2011). "Hydrophilic interaction chromatography of nucleoside triphosphates with temperature as a separation parameter." Journal of Chromatography A **1218**: 5981-5986.

Karinen, R., Andersen, J. M., Ripel, A., Hasvold, I., Hopen, A. B., Mørland, J. og Christophersen, A. S. (2009). "Determination of heroin and its main metabolites in small sample volumes of whole blood and brain tissue by reversed-phase liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Analytical Toxicology **33**: 345-350.

Kauer, J. A. og Malenka, R. C. (2007). "Synaptic plasticity and addiction." Nature Reviews Neuroscience **8**.

Kovac, A., Somikova, Z., Zilka, N. og Novak, M. (2014). "Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of panel of neurotransmitters in cerebrospinal fluid from the rat model for tauopathy." Talanta **119**: 284-290.

Lim, C. og Lord, G. (2002). "Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis." Biological & Pharmaceutical Bulletin **25**: 547-557

Masson, J., Sagn, C., Hamon, E. M. og El Mestikawy, S. (1999). "Neurotransmitter Transporters in the Central Nervous System." Pharmacological Reviews **51**: 439-464.

Matuszewski, B. K., Constanzer, B. K. og Chavez-Eng, C. M. (2003). "Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS." Analytical Chemistry **75**: 3019-3030.

McDowall, R. D. (1989). "Sample preparation for biomedical analysis." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **492**: 3-58.

Merens, W., Willem Van der Does, A. J. og Spinhoven, P. (2007). "The effects of serotonin manipulations on emotional information processing and mood." Journal of Affective Disorders **103**: 43-62.

Mohring, B., Magnusson, O., Thorell, G. og Fowler, C. J. (1986). "Seasonal variations in the stability of monoamines and their metabolites in perchloric acid as measured by high-performance liquid chromatography." Journal of Chromatography A **361**: 291-299.

Moldoveanu, S. C. og David, V. (2013a). Chapter 7 - Mobile phases and their properties. Essentials in modern HPLC separations. Waltham, Elsevier: 363-447.

Moldoveanu, S. C. og David, V. (2013b). Chapter 9 - HPLC analysis. Essentials in modern HPLC separations. Waltham, Elsevier: 465-519.

Murray, K. K., Boyd, R. K., Eberlin, M. N., Langley, G. J., Li, L. og Naito, Y. (2013). "Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013)." Pure and Applied Chemistry **85**: 1515-1609.

Murrin, L. C. (2007). Dopamine. xPharm: The comprehensive pharmacology reference. New York, Elsevier: 1-8.

Mørland, J., Jones, B. L., Palomares, M. L. og Alkana, R. L. (1994). "Morphine-6-glucuronide: A potent stimulator of locomotor activity in mice." Life Sciences **55**: PL163-PL168.

Nestler, E. J. (2005). "Is there a common molecular pathway for addiction?" Nature Neuroscience **8**: 1445 - 1449.

Nicholls, D. G. (1994). Proteins, transmitters and synapses. Oxford, Blackwell science.

Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2004). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget.

Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K. E. (2010). Legemiddelanalyse. Bergen, Fagbokforlaget.

Pérez-Cruet, J., Thoa, N. B. og Ng, L. K. Y. (1975). "Acute effects of heroin and morphine on newly synthesized serotonin in rat brain." Life Sciences **17**: 349-362.

Perry, M., Li, Q. og Kennedy, R. T. (2009). "Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters." Analytica Chimica Acta **653**: 1-22.

Peters, F. T., Drummer, O. H. og Musshoff, F. (2007). "Validation of new methods." Forensic Science International **165**: 216-224.

Pierce, C. R. og Kumaresan, V. (2006). "The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse?" Neuroscience & Biobehavioral Reviews **30**: 215-238.

Poole, C. F. (2003). The essence of chromatography. Amsterdam, Elsevier Science.

Quaiserová-Mocko, V., Novotný, M., Schaefer, L., Fink, G. og Swain, G. (2008). "CE coupled with amperometric detection using a boron-doped diamond microelectrode: validation of a method for endogenous norepinephrine analysis in tissue." Electrophoresis **29**: 441-447.

Rindom, H. (2001). Rusmidlernes biologi- om hjernen, sprut og stoffer. København, Sundhedsstyrelsen.

Romero, L. M. (2010). Fight or flight responses. Encyclopedia of animal behavior. Oxford, Academic Press: 710-714.



Rosano, T. G., Swift, T. A. og Hayes, L. W. (1991). "Advances in Catecholamine and Metabolite Measurements for Diagnosis of Pheochromocytoma." Clinical Chemistry **37**: 1854-1867.

Santos-Fandila, A., Zafra-Gómez, A., Barranco, A., Navalón, A., Rueda, R. og Ramírez, M. (2013). "Quantitative determination of neurotransmitters, metabolites and derivatives in microdialysates by UHPLC–tandem mass spectrometry." Talanta **114**: 79-89.

Segovia, G., Porras, A., Del Arco, A. og Mora, F. (2001). "Glutamatergic neurotransmission in aging: a critical perspective." Mechanisms of Ageing and Development **122**: 1-29.

Sibley, D. R. og Neve, K. (2007). Dopamine receptors. xPharm: The comprehensive pharmacology reference. New York, Elsevier: 1-4.

Siegel, A., Bhatt, S. og Zalcman, S. (2009). Aggression: Neurochemical and molecular mechanisms. Encyclopedia of neuroscience. Oxford, Academic Press: 159-165.

Siegel, G. J., Agranoff, B. W. og Albers, R. W. (1999). Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects. Philadelphia, Lippincott-Raven.

Simonsen, T. og Aarbakke, J. (1997). Illustrert farmakologi. Bergen, Fagbokforlaget.

Steketee, J. D. (2003). "Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psychostimulants." Brain Research Reviews **41**: 203-228.

Su, F., Wang, F., Zhu, R. og Li, H. (2009). "Determination of 5-Hydroxytryptamine, Norepinephrine, Dopamine and Their Metabolites in Rat Brain Tissue by LC–ESI–MS–MS." Chromatographia **69**: 207-213.

Swartz, M. E. (2005). Ultra performance liquid chromatography (UPLC): An introduction. Ultra performance LC separation science redefined, Supplement to LC GC North America: 8-15.

Syslová, K., Rambousek, L., Kuzma, M., Najmanová, V., Bubeníková-Valešová, V., Šlamberová, R. og Kačer, P. (2011). "Monitoring of dopamine and its metabolites in brain microdialysates: Method combining freeze-drying with liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A **1218**: 3382-3391.

Thomas, R. (2008). Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners. Boca Raton, CRC Press.

Thorré, K., Pravda, M., Sarre, S., Ebinger, G. og Michotte, Y. (1997). "New antioxidant mixture for long term stability of serotonin, dopamine and their metabolites in automated microbore liquid chromatography with dual electrochemical detection." Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications **694**: 297-303.

Tyteca, E., Périat, A., Rudaz, S., Desmet, G. og Guillarme, D. (2014). "Retention modeling and method development in hydrophilic interaction chromatography." Journal of Chromatography A **1337**: 116-127.

Uutela, P., Reinilä, R., Harju, K., Piepponen, P., Ketola, R. A. og Kostianen, R. (2009). "Analysis of Intact Glucuronides and Sulfates of Serotonin, Dopamine, and Their Phase I Metabolites in Rat Brain Microdialysates by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry." Analytical Chemistry **81**: 8417-8425.

von Bohlen und Halbach, O. og Dermietzel, R. (2006). Neurotransmitters and neuromodulators : handbook of receptors and biological effects. Weinheim Wiley-VCH.

Wang, H., Chung-Davidson, Y., Li, K., Scott, A. M. og Li, W. (2012). "Quantification of monoamine neurotransmitters and melatonin in sea lamprey brain tissues by high performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry." Talanta **89**: 383-390.

Watanabe, M., Maemura, K., Kanbara, K., Tamayama, T. og Hayasaki, H. (2002). GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs. International Review of Cytology. Kwang, W. J., Academic Press. **213**: 1-47.

Wei, B., Li, Q., Fan, R., Su, D., Chen, X., Jia, Y. og Bi, K. (2014). "Determination of monoamine and amino acid neurotransmitters and their metabolites in rat brain samples by UFLC–MS/MS for the study of the sedative-hypnotic effects observed during treatment with *S. chinensis*." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **88**: 416-422.

Westerink, B. H. C. (1995). "Brain microdialysis and its application for the study of animal behaviour." Behavioural Brain Research **70**: 103-124.

Williams, S. (2004). "Ghost peaks in reversed-phase gradient HPLC: a review and update." Journal of Chromatography A **1052**: 1-11.

Wise, R. A., Leone, P., Rivest, R. og Leeb, K. (1995). "Elevations of nucleus accumbens dopamine and DOPAC levels during intravenous heroin self-administration." Synapse **21**: 140-148.

Yoshitake, T., Kehr, J., Yoshitake, S., Fujino, K., Nohta, H. og Yamaguchi, M. (2004). "Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine." Journal of Chromatography B **807**: 177-183.

Zapata, A., Chefer, V. I., Parrot, S. og Denoroy, L. (2001). Detection and quantification of neurotransmitters in dialysates. Current protocols in neuroscience, John Wiley & Sons.

Zhang, M. og Beyer, C. E. (2006). "Measurement of neurotransmitters from extracellular fluid in brain by in vivo microdialysis and chromatography–mass spectrometry." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis **40**: 492-499.

## 6. APPENDIKS

### 6.1 Undersøkelse av ulike parametere ved bruk av HILIC-kolonner

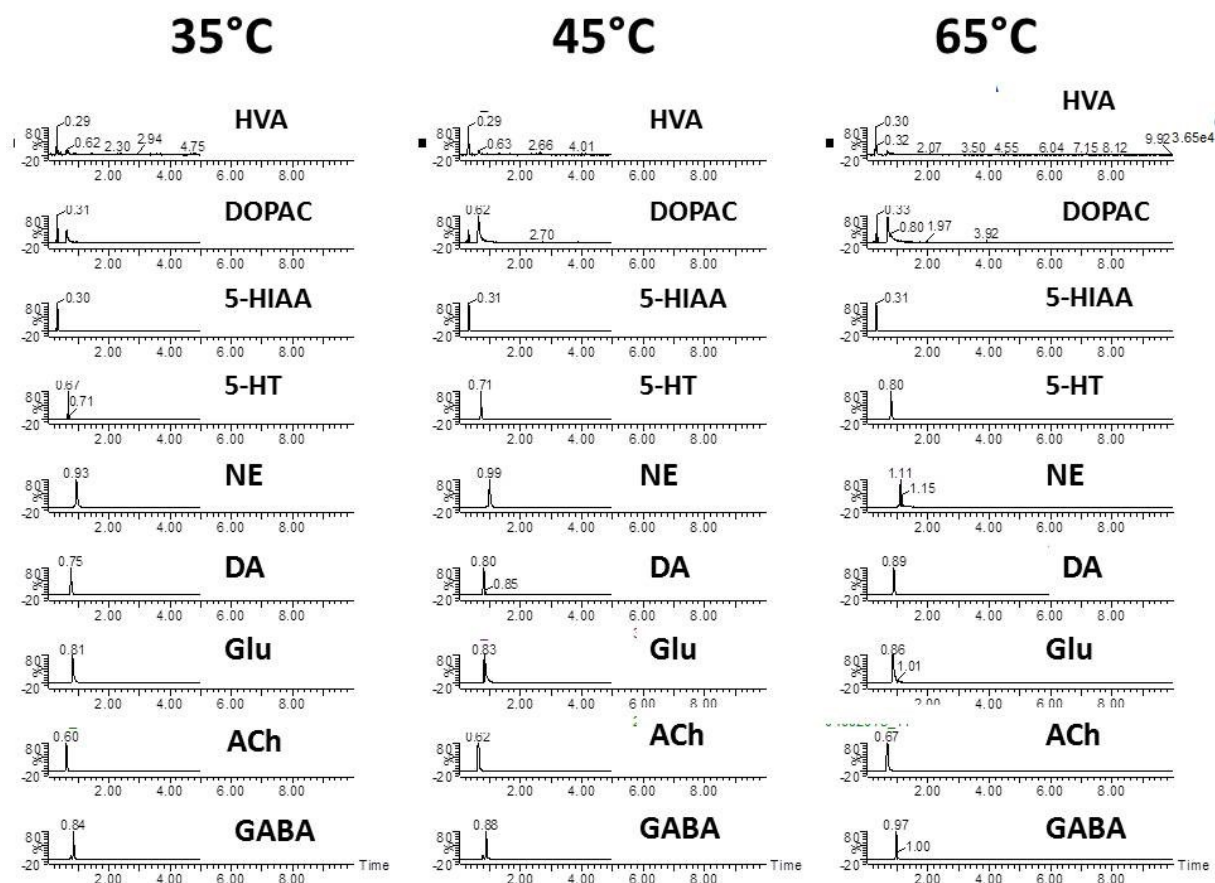
Dette kapitlet inneholder resultater fra innledende forsøk med HILIC-kolonnene hvor ulike parametre ble undersøkt

#### 6.1.1 Effekten av temperatur i HILIC

Temperatur i kolonnen har ofte liten effekt i HILIC sammenlignet med RP-LC. Ved RP-LC minsker retensjonen ved økende temperatur, men i HILIC er retensjonsfaktoren nesten uavhengig av temperatur. Retensjonen i HILIC styres av sannsynligvis av bidrag fra entropi på grunn av ulik fordeling av prøve mellom mobilfasen og SP (Buszewski og Noga 2012). For å undersøke om retensjonen i HILIC ble påvirket av temperatur, ble analyser av standarder ved ulike temperaturer utført. Undersøkelsene ble kun utført på amidkolonnen, før Cortecs-kolonnen og Zic-HILIC-kolonnene ble anskaffet. Det er ikke gitt at de samme effektene vil oppstå ved separasjon på en Zic-HILIC kolonne.

I figur 51 kan det observeres at retensjonstiden til analyttene øker ved økende temperatur. Effekten ser ut til å være størst for aminene og zwitterionene. En økning i retensjon er helt motsatt av hva som ble observert ved økende temperatur i RP (fig 26). Dette har også blitt observert av andre; Aversano *et al.* (2005) fant at retensjonen til kationer økte ved økt temperatur ved HILIC separasjon av toksiner fra skaldyr på en kolonne med amid stasjonærfase. Hao *et al.* (2008) beskrev at restsilanol i silanolbaserte HILIC kolonnematerialer kan danne ioniske bindinger med ladede analytter, med amidkolonnen skal ifølge produsent ha liten grad av restsilanol. Johnsen *et al.* (2011) forklart økningen i retensjon ved at det dannes klaseioner med hydrofile analytter og salt/eller vannmolekyler som skjermer analyttene fra den organiske fasen. Ved økt temperatur går klaseionene i oppløsning og blir mer tilgjengelig for ACN. Analyttene er mindre løselige i ACN, og diffunderer inn i det hydrofile vannlaget på SP. Analyttene tilbringer mer tid i SP, og retensjonsfaktoren øker.

Dersom amidkolonnen skal brukes på et senere tidspunkt, vil det kunne være en fordel med en høyere kolonnetemperatur, dersom retensjonsfaktoren er lav ved romtemperatur.



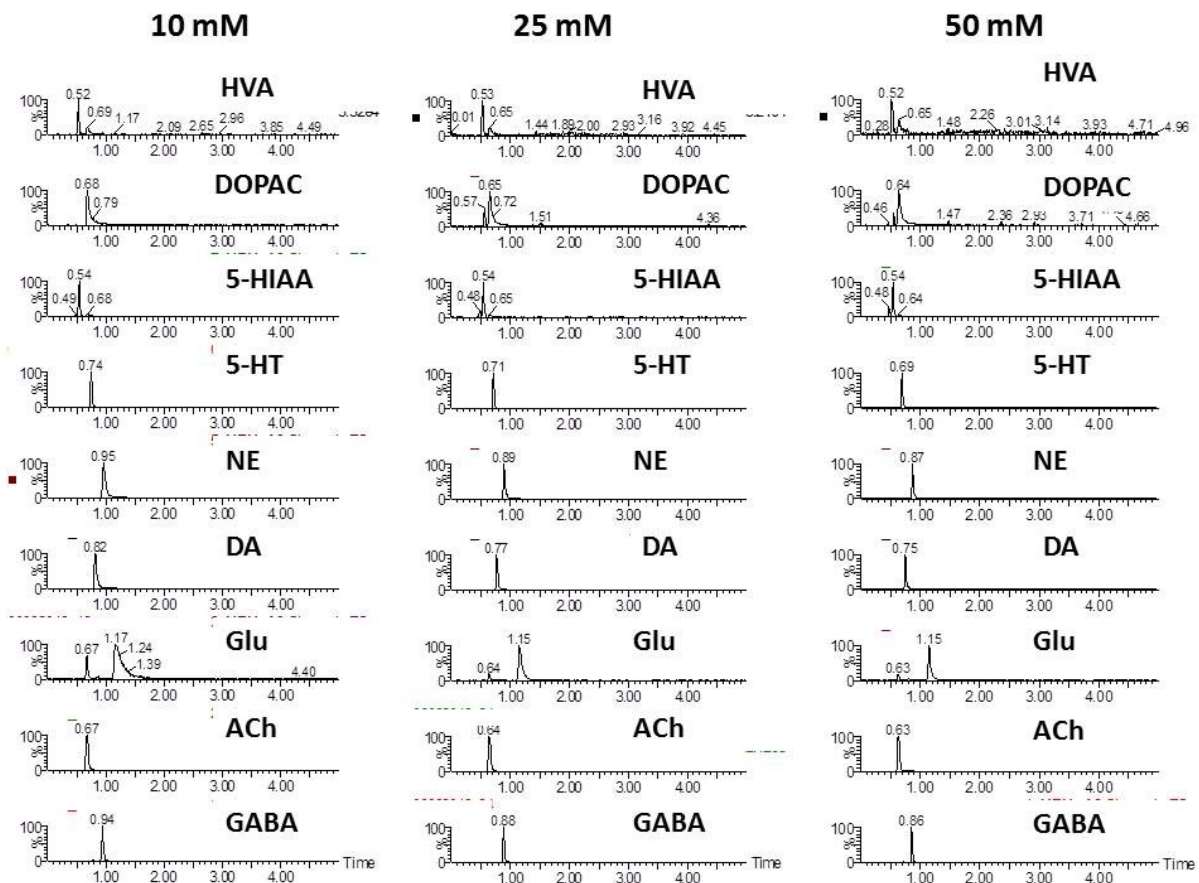
Figur 51: MRM/TIC av ca. 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter løst i 25 mM FA/ACN 20/80 separert på en BEH amid kolonne (50 mm x 2,1 mm i.d ) med en mobilfase bestående av A: 25 mM FA og B: ACN ved ulike temperaturer. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Separasjonen ble utført med isokratisk eluering med 30% A i 4 min.

## 6.1.2 Ionestyrke

Saltkonsentrasjonen kan i HILIC påvirke toppform og retensjon dersom ioniske interaksjoner påvirker retensjonen. Dersom retensjonen ikke styres av ioniske interaksjoner kan imidlertid en økt bufferkonsentrasjon påvirke løselighet. For lav ionekonsentrasjon vil kunne resultere i haledannelse og/eller lavere topper som resultat av for sterk interaksjon med SP (Danaceau et al. 2012).

I et forsøk på å minske graden av haledannelse på amidkolonnen, ble mobilfaser med økende ionestyrke undersøkt (fig 52). Fra figuren kan det observeres at en økning i ionestyrke ga mindre haledannelse, samt en lavere retensjonsfaktor for enkelte av analyttene. Danaceau *et al* utviklet som nevnt i kapittel 3.1.3 en metode for bestemmelse av monoamine neurotransmittere ved bruk av en BEH amid kolonne. Det ble ikke observert større effekter ved økning av ionestyrke, men gradienten ble kun økt til maksimum 30% vandig mobilfase, og den høyeste ionestyrken som ble brukt var 30 mM. Danaceau *et al* ga at en høyere andel vandig buffer kunne ha endret ionestyrken i det hydrofile vannlaget på SP. Dette kan ha brutt sekundære bindinger som analyttene kan ha hatt med SP som har bidratt til haledannelse og sterkere retensjon (Danaceau et al. 2012) Ved forsøket som

ble utført i oppgaven var maksimum andel i gradienten 45 % vandig mobilfase, og høyeste ionestyrke 45 mM. Det kan være en mulighet for at den økte ionestyrken og andelen vandig buffer har bidratt til å bryte sekundære bindinger til SP som førte til mindre haledannelse og lavere retensjonsfaktor.



**Figur 52:** MRM/TIC av ca. 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter løst i 5mM ammoniumformat pH 3,1/ACN 30/70, separert på en amidkolonne (100mm x 2,1 mm i.d.) ved ulike ionestyrker av ammoniumformat (pH 3,1). Mobilfase B var ACN. Mobilfasehastighet var 0,5 mL/min, temperatur var 65 °C og injeksjonsvolum var 7,5  $\mu$ L. Gradientprofilen som ble benyttet var følgende: 30 % A ved start som ble holdt isokratisk i 0,5 min, deretter økt til 45 % i løpet av 0,5 min. 45 % A ble deretter holdt i 1,5 min, før opprinnelig sammensetning ble gjenopprettet iløpet av 0,01 min. Reekvilibreringstid var 4,1 min.

### 6.1.3 Løsningsmiddel i HILIC

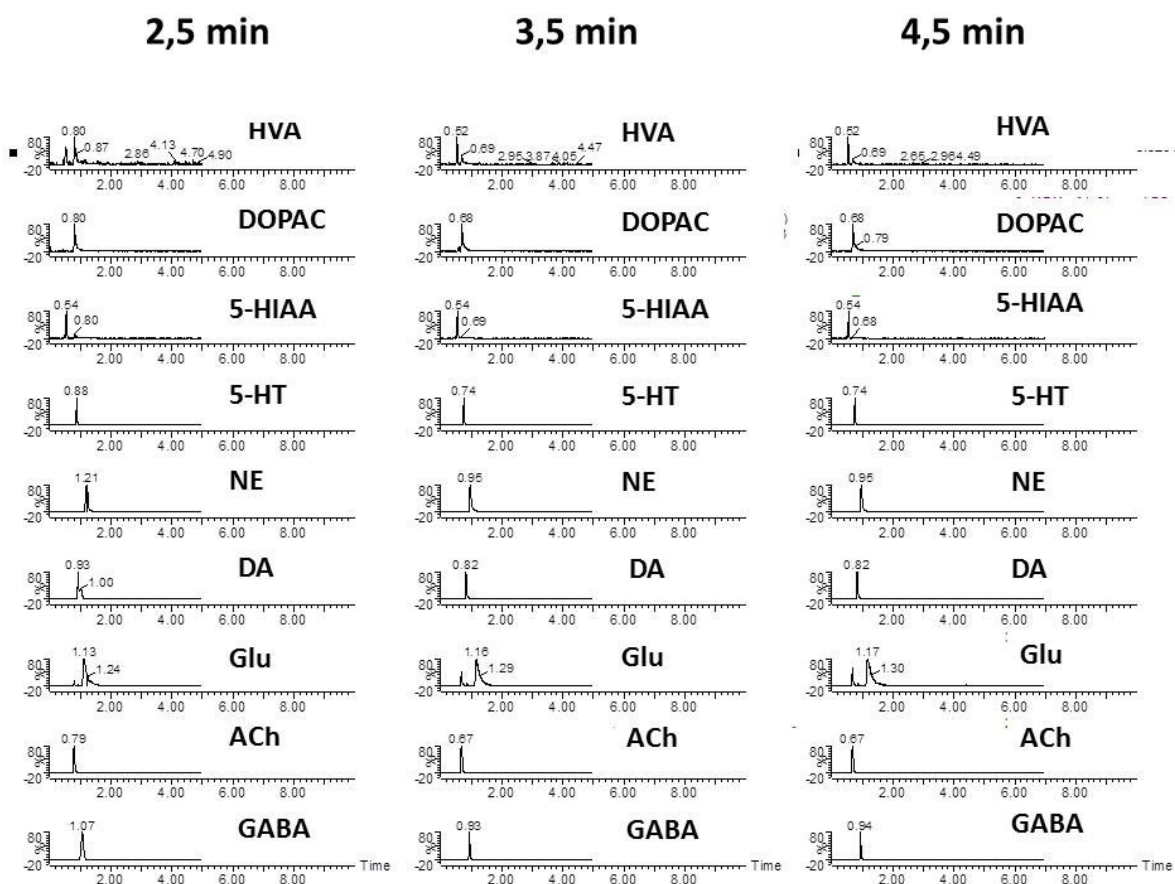
Ettersom vann har størst løsningsmiddelstyrke i HILIC, er det viktig at analyttene er løst i så lite vann som mulig. Hvis ikke vil fordelingen av analyttene til SP bli begrenset og resultere i lavere retensjonsfaktor, dårligere effektivitet og begrenset separasjon (Appelblad et al. 2008).

Analyttene ble fortynnet med en stigende andel vann for å undersøke hvor mye vann som kunne tilsettes før toppform og retensjonsfaktor ble endret. Ved separasjon på Cortecs-kolonnen med en mobilfase bestående av A: 50 mM ammoniumformat pH 3,1 og B: ACN med en gradient på 30 % A ved start som deretter ble økt til 47 % ble det observert toppsplitt ved 30 % A i løsningsene. Dette betyr at andelen vann i prøver ikke måtte

overskride andelen vann ved start av gradient, ettersom løsemiddelstyrken i prøven blir for høy og påvirker kromatografien.

### 6.1.4 Regenereringstid i HILIC

Regenereringstiden etter en gradienteluering kan ha stor betydning i HILIC sammenlignet med RP, ettersom interaksjonene skjer i vannlaget i mobilfasen. Dersom regenereringstiden ikke er lang nok gjenopprettes ikke det opprinnelige vannlaget, og kan resultere i dårlig repeterbarhet, samt drift i retensjonstider (Appelblad et al. 2008). I innledende forsøk med amidkolonnen ble det undersøkt hvilken regenereringstid som krevdes for å få god repeterbarhet og unngå drift i retensjonstider. Standarder av neurotransmittere og metabolitter ble separert under identiske forhold, men med varierende regenereringstid (figur 53).



**Figur 53: MRM/TIC av ca. 1  $\mu$ M neurotransmittere og metabolitter i 5mM ammoniumformat pH 3,1/ACN 30/70, separert på en amidkolonne (100 mm x 2,1 mm i.d.) Ved ulike reekvilibreringstider. Gradientprofilen var tilsvarende som beskrevet i figurtekst 52.**

Toppene til Glu, NE og DA splittet ved en regenereringstid på 2,5 min. Ved en tid på 3,5 min er splitten borte, og retensjonstidene har endret seg for flere av stoffene. Retensjonstidene ved 4,5 min er like som ved 3,5 min. Dette tilsier at systemet er stabilt ved 3,5 min regenereringstid. Dersom kolonnen skal brukes videre bør regenereringstiden være på min 3,5 min ved bruk av den angitte gradienten.

## 6.2 Løsninger brukt til metodeutvikling og validering

I dette kapitlet gis konsentrasjonene i løsningene som ble brukt under utvikling og validering av metodene.

### 6.2.1 Standarder brukt ved undersøkelse av fellingsmetoder for hjernehomogenat

Ved studier av ulike fellingsmetoder for hjernehomogenat ble kalibratorer med konsentrasjoner som gitt i tabell 19 brukt.

**Tabell 19: konsentrasjoner i av neurotransmittere og metabolitter i kalibratorer (K) brukt til studie av ulike fellingsmetoder for hjernehomogenat. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8
5-HT	1,0	5,0	10	25	75	$1,0 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$
5-HIAA	10	25	50	$1,0 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$	$4,5 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$
DA	0,5	2,5	5	12	$2,5 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
3-MT	1,2	6,2	12	31	$2,5 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
HVA	5,0	12	25	50	$1,1 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	$7,5 \cdot 10^2$
DOPAC	10	25	50	$1,0 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
NE	8,0	20	40	80	$1,5 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$
ACh	0,4	1,8	3,5	8,8	75	$1,0 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^2$
Glu	5,0	12	25	50	$6,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$
GABA	10	25	50	$1,0 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^3$

### 6.2.2 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av mikrodialysat

Standarder, kalibratorer og kontroller ble laget ved fortykning av stamløsninger til fire arbeidsløsninger, som deretter ble fortynnet til to bruksløsninger, og igjen fortynnet til kalibratorer/standarder/kontroller. Konsentrasjonene i de ulike løsningene er gitt i tabell 20-23.

**Tabell 20: Konsentrasjoner i arbeidsløsninger brukt ved tillagning av bruksløsninger. Konsentrassjonene er gitt i nM.**

Analytt	Arbeidsløsning 1	Arbeidsløsning 2	Arbeidsløsning 3	Arbeidsløsning 4
5-HT	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^3$
DA	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$2,0 \cdot 10^3$
3-MT	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
ACh	$1,0 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$
5-HIAA	$1,5 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^4$
NE	$7,5 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$
HVA	$7,5 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^4$
DOPAC	$7,5 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$2,7 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$
GABA	$7,5 \cdot 10^3$	$8,0 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^4$



**Tabell 21: Konsentrasjoner i arbeidsløsninger brukt ved tillagning av løsninger til validering/løsninger til kvantifisering av reelle prøver. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	Bruksløsning 1	Bruksløsning 2	Bruksløsning 3	Bruksløsning 4
5-HT	10	$1,5 \cdot 10^2$	35	$2,0 \cdot 10^2$
DA	10	$1,5 \cdot 10^2$	35	$2,0 \cdot 10^2$
3-MT	10	$1,5 \cdot 10^2$	35	$2,0 \cdot 10^2$
ACh	10	$1,5 \cdot 10^2$	35	$2,0 \cdot 10^2$
5-HIAA	$1,5 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^3$
HVA	75	$8,0 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$
DOPAC	75	$8,0 \cdot 10^2$	$2,7 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$
NE	$2,5 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$
Glu	$5,0 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$
GABA	$2,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$

**Tabell 22: Konsentrasjoner av neurotransmitter i kalibratorene/standardene brukt ved validering og analyse av mikrodialysat. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11
5-HT	0,25	0,50	1,0	2,5	5,3	9,0	18	40	72	$1,0 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$
DA	0,25	0,50	1,0	2,5	5,3	9,0	18	40	72	$1,0 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$
3-MT	0,25	0,50	1,0	2,5	5,3	9,0	18	40	72	$1,0 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$
ACh	0,25	0,5	1,0	2,5	5,3	9,0	18	40	72	$1,0 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2$
5-HIAA	3,75	7,5	15	38	$1,4 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^3$	$2,8 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^3$
HVA	1,9	3,8	7,5	19	28	48	96	$2,0 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$
DOPAC	1,9	3,8	7,5	19	28	48	96	$2,0 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$
NE	6,3	13	25	63	28	48	96	$2,0 \cdot 10^2$	$3,8 \cdot 10^2$	$5,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^3$
Glu	13	25	50	125	88	$1,5 \cdot 10^2$	$3,0 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^3$
GABA	5,0	10	20	50	35	60	$1,2 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^2$	$4,8 \cdot 10^2$	$7,0 \cdot 10^2$	$1,4 \cdot 10^3$

**Tabell 23: Konsentrasjoner av neurotransmitter i standarder/kontroller brukt ved validering og analyse av mikrodialysat. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18	S 19
5-HT	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
DA	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
3-MT	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
ACh	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
5-HIAA	7,9	12	16	31	79	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$
HVA	3,9	5,9	7,7	15	39	$1,2 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$
DOPAC	3,9	5,9	7,7	15	39	$1,2 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$
NE	13	20	26	51	129	$1,2 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$
Glu	36	55	72	$14 \cdot 10^1$	$36 \cdot 10^1$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,2 \cdot 10^3$
GABA	14	22	29	57	$14 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$

## 6.2.3 Standarder, kalibratorer og kontroller for analyse av hjernevev

Standarder, kalibratorer og kontroller ble laget ved fortytning av stamløsninger til fire arbeidsløsninger, som deretter fortynt til kalibratorer/kontroller/standarder. Konsentrasjonene i de ulike løsningene er gitt i tabell 24 og 25.

**Tabell 24: Konsentrasjoner i kalibratorer/standardløsninger brukt ved validering og analyse av hjernevev. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10	S 11	S 12
5-HT	0,50	0,80	1,0	2,0	5,0	10	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
5-HIAA	0,70	1,1	1,4	2,9	7,1	14	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
DA	0,50	0,7	1,0	2,0	4,9	10	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
HVA	3,5	5,3	7,0	14	35	70	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
DOPAC	3,5	5,3	7,0	14	35	70	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
3-MT	0,50	0,80	1,0	2,0	5,0	10	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
NE	2,3	3,5	4,7	9,4	23	47	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
ACh	0,50	0,80	1,0	2,1	5,2	10	25	$1,0 \cdot 10^2$	$4,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$
Glu	3,5	5,3	7,0	14	35	70	50	$2,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^3$
GABA	9,8	15	20	39	98	$2,0 \cdot 10^2$	50	$2,0 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^3$	$6,0 \cdot 10^3$

**Tabell 25: Konsentrasjoner i standarder/kontroller brukt til validering og analyse av hjernevev. Konsentrasjonene er gitt i nM.**

Analytt	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18	S 19	S 20	S 21
5-HT	0,5	0,8	1,5	3,0	6,0	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
5-HIAA	0,5	0,8	1,5	3,0	6,0	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
DA	0,5	0,8	1,5	3,0	6,0	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
HVA	2,5	3,7	7,4	15	30	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
DOPAC	2,5	3,7	7,4	15	30	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
3-MT	0,5	0,8	1,5	3,0	6,0	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
NE	4,1	6,1	12	24	49	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
ACh	0,5	0,8	1,5	3,0	6,0	20	$5,0 \cdot 10^2$	$1,0 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^3$
Glu	2,5	3,7	7,4	15	30	40	$1,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^3$
GABA	5,0	7,5	15	30	60	40	$1,0 \cdot 10^3$	$2,0 \cdot 10^3$	$4,8 \cdot 10^3$

## 6.3 Beregninger og statistikk ved valg av prøveopparbeidingsmetode

Ved utvikling av en prøveopparbeidingsmetode for hjernevev ble tre ulike fellingsmetoder undersøkt. Konsentrasjonene som ble målt i hjernevev etter de ulike fellingsmetodene er gitt i tabell 26-28.

**Tabell 26: Konsentrasjoner målt i hjernevev etter felling med ACN/MeOH, samt statistiske beregninger for målingene. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g vev og de grå feltene signaliserer uteliggere.**

Replikat	5-HT	5-HIAA	DA	HVA	3-MT	DOPAC	NE	ACh	Glu	GABA
1	0,6060	1,912	37,50	0,2540	22,60	4,614	32,16	1,416	5551	6565
2	0,2600	0,948	36,73	0,9600	22,63	4,632	11,71	0,9020	2422	2950
3	0,1660	1,192	34,85	0,7820	36,91	8,812	12,31	1,138	2259	2565
4	0,1420	1,502	30,99	0,2520	31,35	9,472	10,71	1,198	2196	2468
5	0,1240	1,580	31,16	0,7140	25,79	8,278	9,063	1,282	2037	2238
6	0,1040	3,470	29,61	0,6400	10,86	27,95	11,70	2,584	2444	2955
Gj.snitt	0,16	1,4	33	0,6	7,2	25	11	1,2	2,3*10 <sup>3</sup>	2,6*10 <sup>3</sup>
SD	0,06	0,37	3,3	0,29	2,4	8,9	1,3	0,19	1,7*10 <sup>2</sup>	3,1*10 <sup>2</sup>
RSD (%)	38	26	10	48	33	35	11	16	7,4	12

**Tabell 27: Konsentrasjoner målt i hjernevev etter felling med maursyre, samt statistiske beregninger for målingene. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g vev og de grå feltene signaliserer uteliggere.**

Replikat	5-HT	5-HIAA	DA	HVA	DOPAC	3-MT	NE	ACh	Glu	GABA
1	0,4125	6,575	68,7	2,300	67,38	18,36	28,39	4,85	6483	8846
2	0,2875	5,450	73,74	2,050	25,5	21,21	30,56	3,913	6268	1,107*10 <sup>4</sup>
3	0,2625	2,463	72,21	0,125	67,48	21,00	28,01	2,938	6709	1,226*10 <sup>4</sup>
4	0,7000	13,86	73,81	0,475	36,2	20,19	25,95	6,525	5727	1,068*10 <sup>4</sup>
5	0,2875	2,700	77,34	0,7625	65,93	22,09	32,22	2,338	7346	1,284*10 <sup>4</sup>
6	2,825	15,59	77,85	2,313	14,94	11,91	29,51	11,81	5860	1,102*10 <sup>4</sup>
Gj.snitt	0,39	7,8	74	1,3	21	46	29	5,4	6,4*10 <sup>3</sup>	1,1*10 <sup>4</sup>
SD	36	57	35	32	29	24	52	30	3,1*10 <sup>3</sup>	4,2*10 <sup>3</sup>
RSD (%)	47	73	5	74	7	51	7	64	9,3	12

**Tabell 28: Konsentrasjoner målt i hjernevev etter felling med perklorisyre, samt statistiske beregninger for målingene. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g vev og de grå feltene signaliserer uteliggere.**

Replikat	5-HT	5-HIAA	DA	HVA	DOPAC	3-MT	NE	ACh	Glu	GABA
1	5,913	290,8	20,10	9,200	244,1	48,63	212,1	206,0	1,232*10 <sup>4</sup>	1,952*10 <sup>4</sup>
2	4,100	465,5	31,38	7,138	358,7	60,91	562,7	204,7	2,867*10 <sup>4</sup>	5,261*10 <sup>4</sup>
3	5,913	436,5	11,66	3,288	61,05	34,58	147,1	169,2	9220	1,918*10 <sup>4</sup>
4	6,363	494,9	11,06	4,438	208,8	55,78	435,0	214,9	3,662*10 <sup>4</sup>	4,267*10 <sup>4</sup>
5	4,563	565,7	9,888	7,700	141,4	29,84	186,8	238,9	8553	1,626*10 <sup>4</sup>
6	1,400	331,4	10,93	0,1880	144,6	32,78	107,1	158,3	8767	1,613*10 <sup>4</sup>
Gj.snitt	4,7	4,3*10 <sup>2</sup>	16	5,3	44	1,9*10 <sup>2</sup>	2,8*10 <sup>2</sup>	2,0*10 <sup>2</sup>	1,7*10 <sup>4</sup>	2,8*10 <sup>4</sup>
SD	2	1,0*10 <sup>2</sup>	8	3,3	13	1,0*10 <sup>2</sup>	1,8*10 <sup>2</sup>	30	1,2*10 <sup>4</sup>	1,6*10 <sup>4</sup>
RSD (%)	39	24	54	62	30	53	66	15	70	57

## 6.4 Beregninger og statistikk for validering av analyse av mikrodialysat

Dette kapitlet inneholder rådata og statistiske beregninger fra valideringen av analyse av mikrodialysat.

### 6.4.1 Repeterbarhet og nøyaktighet

Repetierbarhet ble bestemt ved analyse av syv standarder i ti løsningsreplikater, og er gitt i tabell 29-36. Tall som ble funnet til å være uteliggere (merket med grått i tabell) og lave konsentrasjonsnivåer hvor flere standarder ble kvantifisert til å være 0 nM ble ikke tatt med i beregning av gjennomsnitt, SD, RSD og bias.

**Tabell 29: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for 5-HT undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.**

	5-HT						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,77</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Replikat</b>							
1A	0,4695	0,5848	2,279	4,948	20,11	41,62	61,30
1B	0,6820	0,6461	1,924	5,844	20,26	43,31	63,83
1C	0,5375	0,7726	2,373	4,947	21,22	40,93	62,78
1D	0,4566	0,5464	1,646	5,789	21,17	42,02	64,96
1E	0,5749	0,7794	2,062	4,969	21,09	40,98	62,72
1F	0,6887	0,7257	1,900	5,209	21,78	42,27	63,84
1G	0,6595	0,6050	2,329	5,069	21,29	41,78	65,49
1H	0,2989	0,6525	1,751	4,245	21,14	41,01	63,82
1I	0,4556	0,7388	2,022	5,123	20,63	41,04	65,98
1J	0,3486	0,7906	2,213	5,138	20,87	42,27	65,52
Gjennomsnitt (nM)	0,52	0,68	2,0	5,1	21	42	64
SD	0,14	0,09	0,25	0,45	0,50	0,77	1,5
<b>RSD %</b>	<b>26</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>8,8</b>	<b>2,4</b>	<b>1,9</b>	<b>2,3</b>
<b>Bias %</b>	<b>103</b>	<b>89</b>	<b>102</b>	<b>103</b>	<b>105</b>	<b>104</b>	<b>107</b>

Tabell 30: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for 5-HIAA undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere

	5-HIAA						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>7,9</b>	<b>12,1</b>	<b>31,4</b>	<b>78,6</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1200</b>
<b>Replikat</b>							
1A	11,58	11,53	31,44	72,34	410,4	810,3	1306
1B	9,087	12,21	31,58	79,30	424,0	814,7	1266
1C	9,257	10,76	32,15	77,81	442,0	843,2	1254
1D	8,315	11,06	31,21	75,32	414,5	890,0	1283
1E	8,092	11,41	33,38	77,94	434,6	859,1	1302
1F	7,673	11,49	29,81	72,29	427,2	816,5	1312
1G	7,939	11,21	29,13	75,12	418,5	915,3	1242
1H	7,677	12,25	30,81	75,32	426,0	845,7	1304
1I	7,776	11,34	31,86	74,55	409,6	846,9	1356
1J	7,405	11,12	29,78	79,63	423,2	813,4	1333
Gjennomsnitt (nM)	8,1	11,4	31	76	4,2*10 <sup>2</sup>	8,5*10 <sup>2</sup>	1,3*10 <sup>2</sup>
SD	0,64	0,48	1,3	2,6	10	35	35
<b>RSD %</b>	<b>8</b>	<b>4,2</b>	<b>4,1</b>	<b>3,5</b>	<b>2,4</b>	<b>4,2</b>	<b>2,7</b>
<b>Bias %</b>	<b>103</b>	<b>95</b>	<b>99</b>	<b>97</b>	<b>106</b>	<b>106</b>	<b>108</b>

Tabell 31: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for DA undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater.

	DA						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,77</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Replikat</b>							
1A	0,3908	0,4878	1,752	5,662	20,95	39,75	62,60
1B	0,6030	0,5356	2,195	5,401	21,73	41,38	60,68
1C	0,4108	0,7727	2,060	4,948	21,72	39,91	63,10
1D	0,5139	0,6271	2,123	5,464	20,66	39,52	61,57
1E	0,6836	0,8518	1,556	6,032	20,69	39,15	58,64
1F	0,4268	0,7425	1,729	6,182	20,72	40,60	63,96
1G	0,4426	0,9139	2,129	5,214	21,02	42,64	57,78
1H	0,4629	0,6312	1,811	6,072	20,35	39,70	61,48
1I	0,6047	0,4954	1,911	5,789	20,15	40,31	63,38
1J	0,4407	0,6128	1,695	5,323	18,86	39,08	64,18
Gjennomsnitt (nM)	0,5	0,67	1,9	5,6	21	40	62
SD	0,01	0,5	0,22	0,41	0,82	1,1	2,2
<b>RSD %</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>7,3</b>	<b>4</b>	<b>2,7</b>	<b>3,5</b>
<b>Bias %</b>	<b>100</b>	<b>87</b>	<b>95</b>	<b>112</b>	<b>103</b>	<b>101</b>	<b>103</b>

Tabell 32: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for NE undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere

	NE					
	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>19,8</b>	<b>51,4</b>	<b>128,6</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>360</b>
<b>Replikat</b>						
1A	19,94	34,98	153,6	133,1	344,4	417,9
1B	11,05	17,41	153,9	86,03	213,6	360,6
1C	19,70	95,35	108,6	94,85	220,4	369,3
1D	22,73	42,08	118,6	127,7	302,9	441,2
1E	28,72	49,30	102,5	63,74	322,5	374,6
1F	27,42	22,45	184,5	139,3	259,08	326,55
1G	7,40	32,52	83,31	151,6	258,4	480,6
1H	17,95	37,15	193,6	109,0	188,7	476,4
1I	2,387	39,89	114,0	134,4	270,5	302,8
1J	8,508	53,43	143,7	99,8	308,6	442,0
Gjennomsnitt (nM)	17	42	1,4*10 <sup>2</sup>	1,1*10 <sup>2</sup>	2,7*10 <sup>2</sup>	4,0*10 <sup>2</sup>
SD	8,9	22	36	28	51	62
<b>RSD %</b>	<b>53</b>	<b>51</b>	<b>27</b>	<b>24</b>	<b>19</b>	<b>15</b>
<b>Bias %</b>	<b>84</b>	<b>83</b>	<b>105</b>	<b>95</b>	<b>112</b>	<b>111</b>

Tabell 33: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for ACh undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere

	ACh						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,77</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Replikat</b>							
1A	0,7187	0,7770	2,323	5,277	22,81	45,84	68,31
1B	0,6366	0,8061	2,132	5,350	22,57	48,43	68,12
1C	0,4836	0,7829	2,378	5,404	23,32	46,75	68,23
1D	0,7283	0,9862	2,274	5,552	22,12	48,36	67,78
1E	0,6093	1,0180	2,207	5,912	22,68	46,13	61,65
1F	0,5416	0,9865	2,386	5,970	22,64	44,98	67,85
1G	0,4894	0,8521	2,237	5,003	23,89	48,69	61,34
1H	0,7227	1,0403	2,295	5,638	23,10	48,16	66,83
1I	0,6344	0,8639	2,198	5,403	23,64	47,03	67,80
1J	0,7196	0,8564	2,156	5,550	21,58	44,95	69,60
Gjennomsnitt (nM)	0,63	0,90	2,3	5,5	23	47	67
SD	0,10	0,10	0,09	0,29	0,69	1,4	2,8
<b>RSD %</b>	<b>15</b>	<b>11</b>	<b>3,9</b>	<b>5,3</b>	<b>3,0</b>	<b>3,1</b>	<b>4,3</b>
<b>Bias %</b>	<b>126</b>	<b>116</b>	<b>113</b>	<b>110</b>	<b>114</b>	<b>117</b>	<b>111</b>

Tabell 34: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for GABA undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater.

	GABA						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>14,3</b>	<b>22</b>	<b>57,1</b>	<b>142,9</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>360</b>
<b>Replikat</b>							
1A	15,23	23,77	61,81	131,2	119,5	232,3	371,1
1B	12,53	10,36	43,42	183,8	103,8	182,1	356,1
1C	2,233	30,23	55,73	178,5	109,0	224,5	402,4
1D	12,62	31,43	51,96	143,9	108,2	257,4	357,0
1E	9,006	33,36	56,85	129,3	100,2	180,0	364,8
1F	15,43	31,98	79,30	152,4	115,5	228,2	330,6
1G	15,06	12,27	58,15	133,5	113,0	248,2	374,0
1H	6,099	19,85	46,51	135,6	113,0	238,2	336,9
1I	17,15	25,46	40,88	106,8	123,8	191,6	381,2
1J	6,352	19,99	43,68	187,9	87,5	220,1	365,0
Gjennomsnitt (nM)	11	24	54	1,5*10 <sup>2</sup>	1,1*10 <sup>2</sup>	2,2*10 <sup>2</sup>	3,6*10 <sup>2</sup>
SD	5	8,2	11,4	27	10	2,7*10 <sup>2</sup>	21
<b>RSD %</b>	<b>45</b>	<b>34</b>	<b>21</b>	<b>18</b>	<b>9,5</b>	<b>12</b>	<b>5,7</b>
<b>Bias %</b>	<b>78</b>	<b>108</b>	<b>94</b>	<b>104</b>	<b>91</b>	<b>92</b>	<b>101</b>

Tabell 35: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for Glu undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater.

	Glu						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>35,7</b>	<b>55</b>	<b>142,9</b>	<b>357,1</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1200</b>
<b>Replikat</b>							
1A	33,70	65,96	155,1	393,5	406,1	806,8	1310
1B	40,97	77,46	152,1	392,9	392,8	924,8	1317
1C	22,99	64,83	180,0	417,7	448,2	798,7	1402
1D	29,59	66,01	158,5	400,2	411,5	876,2	1359
1E	39,85	51,57	156,3	385,5	460,9	889,3	1337
1F	33,10	60,81	159,4	390,7	418,6	873,0	1242
1G	40,76	53,75	175,2	364,4	419,6	833,7	1317
1H	44,03	73,56	153,6	374,3	438,7	833,4	1255
1I	39,08	59,27	170,0	373,2	432,2	837,0	1335
1J	37,75	64,92	163,0	392,6	426,5	940,2	1268
Gjennomsnitt (nM)	36	64	1,6*10 <sup>2</sup>	3,9*10 <sup>2</sup>	4,3*10 <sup>2</sup>	8,6*10 <sup>2</sup>	1,3*10 <sup>3</sup>
SD	6,0	8,0	10	15	20	48	49
<b>RSD %</b>	<b>18</b>	<b>13</b>	<b>5,9</b>	<b>3,9</b>	<b>4,8</b>	<b>5,5</b>	<b>3,7</b>
<b>Bias %</b>	<b>101</b>	<b>116</b>	<b>114</b>	<b>109</b>	<b>106</b>	<b>108</b>	<b>110</b>

Tabell 36: Repeterbarhet og nøyaktighet innen serie for 3-MT undersøkt ved analyse av sju standardløsninger i ti løsningsreplikater. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere

	3-MT						
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7
<b>Teoretisk verdi (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,77</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Replikat</b>							
1A	0,3814	0,7098	1,906	4,856	21,03	40,55	62,88
1B	0,5269	0,6956	2,064	5,056	21,64	40,09	60,95
1C	0,4413	0,5226	2,082	4,928	21,08	41,36	60,49
1D	0,3954	0,7184	1,987	4,932	20,52	40,52	61,47
1E	0,3849	0,7675	1,926	4,983	20,45	41,66	61,73
1F	0,4492	0,7647	1,886	5,060	21,18	42,12	61,71
1G	0,4472	0,6904	1,998	5,115	21,36	41,23	63,96
1H	0,4281	0,8231	1,910	4,835	21,32	41,16	61,35
1I	0,4009	0,6345	2,056	5,041	20,47	41,78	63,32
1J	0,3961	0,7569	2,035	5,170	20,50	42,66	61,80
Gjennomsnitt (nM)	0,43	0,71	2,0	5,0	21	41	62
SD	0,04	0,08	0,07	0,11	0,44	0,78	1,09
<b>RSD %</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>3,7</b>	<b>2,2</b>	<b>2,1</b>	<b>1,9</b>	<b>1,8</b>
<b>Bias %</b>	<b>85</b>	<b>92</b>	<b>99</b>	<b>100</b>	<b>105</b>	<b>103</b>	<b>103</b>

## 6.4.2 Intermediær presisjon

Intermediær presisjon og nøyaktighet ble undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier fordelt over åtte dager og er gitt i tabell 37-44. Dag 2 og 8 ble ikke nivå tre analysert fordi standard 3 ikke var tatt med i valideringen ved analyse dag 2 og nivå tre ikke ble tillaget ved dag 8.



Tabell 37: Intermediær presisjon og nøyaktighet for 5-HT undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.

	5-HT							
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
Teoretisk Verdi (nM)	0,5	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
Dag								
1A	0,3587	0,4712	1,154	2,087	6,061	22,64	46,36	73,25
1B	0,4555	0,9615	0,9906	1,550	5,332	22,46	45,48	69,48
1C	0,6859	0,4856	0,9343	1,888	5,391	22,73	43,63	65,74
2A	0,3671	0,8988		2,347	4,485	20,78	41,80	62,61
2B	0,6372	0,7538		1,657	4,970	19,31	40,55	63,51
2C	0,9053	0,4717		1,984	5,290	21,58	43,00	63,79
3A	0,5904	0,8308	1,577	1,522	5,103	18,98	41,46	60,02
3B	0,7969	1,0829	1,296	1,884	4,441	20,51	39,94	59,14
3C	0,7766	1,0601	0,8581	2,089	5,015	19,95	44,05	55,21
4A	0,3642	0,9860	1,054	2,346	5,754	23,14	48,51	66,52
4B	0,4306	0,8480	1,090	2,129	5,280	21,98	43,21	66,37
4C	0,6975	0,7334	1,072	1,577	5,317	21,21	51,24	65,81
5A	0,4911	0,5902	0,6714	2,345	6,188	23,23	42,21	67,57
5B	0,3271	0,5391	0,8461	1,931	4,819	23,22	42,81	61,55
5C	0,6423	0,8195	1,010	2,118	4,797	22,47	42,65	61,79
6A	0,7748	0,9495	1,075	1,751	4,876	20,84	42,01	66,17
6B	0,6543	0,8837	1,029	2,288	4,628	21,76	41,45	60,48
6C	0,5617	0,6652	1,187	2,506	4,677	20,46	39,35	64,18
7A	0,5865	0,8550	1,221	2,084	5,233	23,10	51,09	71,45
7B	0,8320	0,6084	0,7720	1,769	5,475	22,14	46,74	68,12
7C	0,4894	0,7677	0,8274	1,744	5,470	25,44	43,36	68,43
8A	0,5836	0,7346		1,660	5,290	20,31	46,15	55,92
8B	0,5951	0,7967		2,239	4,151	20,91	49,47	69,42
8C	0,6035	0,5257		1,720	4,719	23,45	47,40	72,44
Gjennomsnitt (nM)	0,59	0,76	1,0	2,0	5,1	22	44	65
SD	0,16	0,19	0,21	0,29	0,49	1,5	3,4	4,6
RSD (%)	27	24	20	15	10	7	8	7
Bias (%)	118	99	102	98	102	109	110	108

**Tabell 38: Intermediær presisjon og nøyaktighet for 5-HIAA undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.**

	5-HIAA							
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>7,9</b>	<b>12,1</b>	<b>15,7</b>	<b>31,4</b>	<b>78,6</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1200</b>
<b>Dag</b>								
1A	13,52	12,49	17,10	27,57	62,70	382,2	796,3	1129
1B	11,93	15,56	14,42	27,33	64,91	384,7	822,7	1087
1C	11,79	13,26	17,02	24,47	59,67	417,6	747,6	1144
2A	11,88	12,48		29,22	78,35	438,4	862,7	1367
2B	7,669	10,76		32,02	84,22	446,0	889,7	1322
2C	7,603	10,94		31,22	81,37	412,8	850,7	1296
3A	9,780	14,36	14,83	27,59	62,56	379,0	786,8	1204
3B	9,718	13,26	15,93	26,77	66,11	390,6	800,1	1223
3C	9,498	13,50	14,27	27,92	64,18	408,5	795,9	1174
4A	9,896	13,03	14,20	29,05	65,91	463,6	901,9	1282
4B	10,01	12,99	15,31	28,39	67,50	430,1	845,3	1270
4C	9,435	13,46	14,72	28,50	64,09	431,7	957,0	1211
5A	8,302	10,50	15,85	29,55	70,65	466,6	873,1	1389
5B	6,297	10,71	14,97	30,51	70,58	447,9	824,4	1153
5C	6,012	9,23	11,43	24,65	70,49	439,3	780,9	1122
6A	9,968	11,32	13,59	29,64	70,98	465,0	842,2	1305
6B	9,566	11,80	12,56	27,17	67,29	431,4	794,1	1245
6C	7,138	10,44	15,34	29,89	67,27	412,6	788,4	1251
7A	9,986	12,80	14,97	29,77	68,51	466,2	981,5	1395
7B	8,783	13,36	14,80	31,25	73,86	474,2	1008,3	1460
7C	12,90	11,97	15,58	29,82	65,79	499,1	859,9	1297
8A	7,962	7,496		22,29	63,67	418,8	866,3	1140
8B	6,620	6,944		23,17	56,35	448,9	943,6	1240
8C	2,923	6,152		18,36	57,47	493,1	931,5	1344
Gjennomsnitt (nM)	9,1	12	15	28	68	433	853	1248
SD	2,4	2,3	1,4	2,6	6,8	32	69	98
<b>RSD (%)</b>	<b>26</b>	<b>20</b>	<b>9,3</b>	<b>9,1</b>	<b>10</b>	<b>7,4</b>	<b>8,0</b>	<b>7,9</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>116</b>	<b>96</b>	<b>94</b>	<b>90</b>	<b>86</b>	<b>108</b>	<b>107</b>	<b>104</b>

Tabell 39: Intermediær presisjon og nøyaktighet for DA undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.

	DA							
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Sann verdi (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,77</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Dag</b>								
1A	0,8533	1,353	0,8276	1,692	5,285	21,79	46,58	66,01
1B	0,8899	1,111	1,113	2,174	5,249	21,84	44,40	67,77
1C	0,7946	1,100	1,106	1,692	5,198	21,42	43,75	63,44
2A	0,5992	1,1247		2,053	4,414	20,26	42,81	64,95
2B	0,5315	0,8642		2,100	5,257	20,95	41,52	61,12
2C	0,4835	0,4771		1,787	5,024	19,68	40,15	63,09
3A	0,5646	1,210	1,158	1,416	3,576	24,51	34,45	70,21
3B	0,6852	0,8358	0,9445	1,428	3,387	19,74	38,88	53,15
3C	0,1343	1,334	0,7997	2,288	5,312	17,66	34,25	57,78
4A	0,3889	0,8454	0,8639	1,605	4,545	23,27	47,00	65,84
4B	0,5001	0,7104	0,9541	2,231	4,799	21,29	48,14	65,95
4C	0,3944	0,5139	0,9080	1,401	5,990	20,90	47,34	57,53
5A	0,5590	0,9401	0,9143	2,031	5,381	20,36	41,57	66,34
5B	0,4574	0,6325	1,206	2,299	5,560	23,56	43,96	62,66
5C	0,4991	0,7772	1,006	2,536	5,192	22,81	42,33	64,60
6A	0,4082	0,6778	1,164	1,735	4,918	19,01	38,91	61,87
6B	0,5156	0,6200	0,9352	1,804	4,698	18,59	41,01	61,45
6C	0,4425	0,7922	1,048	1,650	5,529	17,23	38,79	63,77
7A	0,8174	0,9888	0,9992	2,263	5,090	19,06	46,55	70,14
7B	0,8450	0,9772	0,9233	2,043	4,585	21,14	45,44	61,61
7C	0,7464	0,7250	1,172	2,267	4,752	20,90	34,55	55,12
8A	0,2568	0,6400		1,994	5,532	21,29	41,57	51,71
8B	0,6337	0,7313		1,388	5,369	20,13	48,16	59,65
8C	0,4835	0,4771		1,787	5,024	19,68	40,15	63,09
Gjennomsnitt (nM)	0,56	0,85	1,00	1,9	5,0	21	42	62
SD	0,19	0,25	0,13	0,33	0,59	1,8	4,3	4,9
<b>RSD (%)</b>	<b>34</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>12</b>	<b>8,7</b>	<b>10</b>	<b>7,8</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>112</b>	<b>111</b>	<b>100</b>	<b>95</b>	<b>100</b>	<b>104</b>	<b>106</b>	<b>104</b>

Tabell 40: Intermediær presisjon og nøyaktighet for NE undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Målingene av standard 1-3 ble ikke tatt med i beregningene ettersom flere av replikatene ble kvantifisert til 0 nM. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.

	NE				
	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>51,4</b>	<b>129</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>360</b>
<b>Dag</b>					
1A	71,30	164,3	95,95	346,8	314,1
1B	19,35	20,11	144,2	351,0	335,3
1C	44,33	212,8	83,99	247,5	316,6
2A	67,81	162,1	186,7	369,8	353,9
2B	46,11	136,6	75,92	295,0	341,2
2C	70,43	137,2	101,8	217,2	374,3
3A	58,70	193,2	91,48	208,1	303,6
3B	41,82	92,5	84,15	238,5	302,9
3C	79,54	88,8	167,0	205,6	408,3
4A	63,22	217,0	155,8	215,5	496,5
4B	16,83	102,7	157,9	304,4	295,3
4C	53,18	141,7	135,1	271,0	357,3
5A	36,59	118,4	169,8	251,4	448,0
5B	75,37	112,3	125,7	229,7	439,5
5C	52,46	206,4	152,5	287,6	328,9
6A	61,65	111,5	129,8	180,4	425,6
6B	28,88	127,8	108,5	159,7	341,6
6C	49,16	257,8	123,9	325,4	302,7
7A	112,15	121,6	163,7	404,2	361,1
7B	62,41	248,6	86,80	193,7	439,4
7C	140,35	206,4	152,5	239,1	423,6
8A	99,82	174,1	141,0	153,3	1303,8
8B	64,46	291,2	0,0	263,6	262,4
8C	312,7	258,2	314,3	518,9	423,6
Gjennomsnitt (nM)	62	163	129	270	365
SD	28	65	33	85	61
<b>RSD (%)</b>	<b>46</b>	<b>40</b>	<b>26</b>	<b>31</b>	<b>17</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>120</b>	<b>126</b>	<b>107</b>	<b>112</b>	<b>101</b>

**Tabell 41: Intermediær presisjon og nøyaktighet for ACh undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.**

	ACh							
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,77</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Dag</b>								
1A	0,4404	1,104	1,015	2,210	5,595	23,05	53,10	71,01
1B	0,7190	0,9026	1,019	2,149	6,081	22,24	48,54	70,87
1C	0,5179	0,5949	1,095	2,352	5,423	23,52	45,71	71,77
2A	0,8309	0,9508		2,214	5,429	23,85	48,50	71,08
2B	0,6050	0,9044		2,239	5,621	23,11	45,32	68,99
2C	0,5182	0,9760		2,274	5,429	22,80	44,24	70,62
3A	1,332	0,9757	1,355	2,870	5,628	25,25	52,23	87,84
3B	0,7097	0,7194	1,310	2,569	4,945	24,87	47,84	66,28
3C	1,241	0,8315	1,003	2,250	6,317	31,46	40,23	71,76
4A	0,5903	1,005	1,056	2,218	5,869	24,70	53,43	79,53
4B	0,5511	0,8684	1,169	2,606	5,773	25,67	52,50	73,86
4C	0,4326	0,7205	1,082	2,016	6,165	23,68	55,37	67,46
5A	0,5282	0,8507	0,9369	2,170	5,316	22,28	45,34	69,13
5B	0,5445	0,7827	1,047	2,098	5,014	24,52	45,43	64,91
5C	0,6104	0,9047	1,174	2,016	5,105	23,84	44,33	73,29
6A	0,6369	0,9192	1,191	1,929	5,274	21,13	41,64	70,70
6B	0,5311	0,8269	0,8937	1,863	5,273	22,06	43,16	66,06
6C	0,6718	0,8693	1,208	2,265	5,449	20,92	43,33	66,88
7A	0,5440	0,8608	0,9487	2,061	5,937	21,07	54,51	77,83
7B	0,4702	0,8752	1,058	2,315	5,725	24,10	46,41	68,36
7C	0,4180	0,7799	0,9758	2,107	5,558	23,63	41,41	64,65
8A	0,6658	0,9890		2,380	5,826	23,86	47,90	60,84
8B	0,6062	0,8910		2,408	5,603	23,50	54,09	77,37
8C	0,7097	0,9771		2,356	5,559	25,54	53,10	81,57
<b>Gjennomsnitt (nM)</b>	<b>0,61</b>	<b>0,88</b>	<b>1,1</b>	<b>2,2</b>	<b>5,6</b>	<b>23</b>	<b>48</b>	<b>71</b>
<b>SD</b>	<b>0,17</b>	<b>0,11</b>	<b>0,13</b>	<b>0,22</b>	<b>0,35</b>	<b>1,4</b>	<b>4,7</b>	<b>6,0</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>28</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>6,2</b>	<b>5,8</b>	<b>9,7</b>	<b>8,5</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>123</b>	<b>114</b>	<b>109</b>	<b>112</b>	<b>112</b>	<b>117</b>	<b>120</b>	<b>119</b>

Tabell 42: Intermediær presisjon og nøyaktighet for GABA undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Målingene av standard 1 ble ikke tatt med i beregningene ettersom flere av replikatene ble kvantifisert til 0 nM. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.

	GABA						
	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>22,0</b>	<b>28,6</b>	<b>57,1</b>	<b>143</b>	<b>120</b>	<b>240</b>	<b>360</b>
<b>Dag</b>							
1A	17,32	24,42	42,85	153,0	148,4	272,5	398,2
1B	16,60	29,57	40,62	135,2	123,2	287,4	384,4
1C	18,20	25,43	72,37	126,3	126,2	253,2	335,3
2A	20,08		50,28	135,0	142,6	272,9	338,4
2B	12,68		48,43	145,2	96,2	237,1	343,2
2C	13,80		65,22	152,0	158,2	216,7	364,5
3A	0,00	46,83	61,95	219,8	92,2	272,3	383,2
3B	45,79	27,94	47,32	106,2	142,7	316,4	385,6
3C	25,22	36,28	55,49	162,3	88,4	279,9	518,9
4A	18,38	31,16	58,05	131,5	128,9	253,5	380,0
4B	33,91	28,70	58,99	131,8	125,1	262,3	409,7
4C	22,96	33,95	62,20	131,5	94,3	254,2	339,7
5A	26,73	23,70	45,75	128,4	125,4	218,1	363,7
5B	13,64	27,96	72,03	110,6	100,7	239,6	273,0
5C	20,37	20,87	41,31	106,7	93,7	228,3	379,0
6A	33,05	36,47	48,39	110,9	103,8	219,8	352,6
6B	26,82	37,06	49,03	123,7	95,8	229,4	336,0
6C	23,56	45,87	62,57	123,4	102,6	210,1	337,2
7A	25,50	27,29	50,30	108,9	95,4	234,2	321,5
7B	27,21	32,38	57,79	152,0	100,7	221,4	280,7
7C	23,93	25,44	55,82	159,0	113,5	197,8	309,2
8A	22,34		58,55	137,9	114,5	260,6	352,6
8B	9,658		61,97	154,0	139,5	271,0	405,7
8C	9,889		67,56	145,9	130,1	290,8	429,3
Gjennomsnitt (nM)	22	31	56	134	116	250	363
SD	8,4	7,2	9,2	17	21	30	51
<b>RSD (%)</b>	<b>38</b>	<b>23</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>14</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>100</b>	<b>109</b>	<b>97</b>	<b>93</b>	<b>97</b>	<b>104</b>	<b>101</b>

**Tabell 43: Intermediær presisjon og nøyaktighet for Glu undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Målingene av standard 1 ble ikke tatt med i beregningene ettersom flere av replikatene ble kvantifisert til 0 nM. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.**

	Glu						
	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>55</b>	<b>71,5</b>	<b>143</b>	<b>357</b>	<b>400</b>	<b>800</b>	<b>1200</b>
<b>Dag</b>							
1A	38,10	58,7	145,0	332,1	457,6	834,0	1171
1B	60,35	47,8	144,2	357,4	383,2	851,6	1345
1C	51,44	41,8	169,4	270,9	344,7	728,9	1062
2A	0,00		139,5	385,0	431,1	826,7	1148
2B	55,77		142,5	358,7	425,7	777,3	1041
2C	53,41		128,7	352,5	420,3	701,2	1136
3A	66,38	51,8	203,0	323,4	460,6	774,1	1158
3B	7,20	95,3	180,7	398,3	413,0	794,3	1077
3C	75,25	40,9	163,9	341,8	315,4	655,9	1334
4A	90,12	55,9	137,0	429,8	450,4	941,7	1472
4B	59,53	152,2	162,7	377,4	488,3	854,1	1232
4C	39,26	65,7	91,1	314,9	490,2	931,3	1045
5A	54,25	65,8	198,3	512,4	484,5	965,6	1433
5B	49,47	89,2	183,4	358,2	549,6	1010,9	1382
5C	54,61	85,8	155,7	378,2	495,3	724,5	1432
6A	61,43	72,9	205,3	518,8	491,0	971,3	1438
6B	56,66	96,3	190,4	364,8	556,0	1016,5	1387
6C	61,79	92,9	162,7	384,9	501,8	730,6	1436
7A	67,60	64,3	99,7	343,7	308,2	781,8	1053
7B	52,02	44,3	154,7	340,2	329,2	756,1	917
7C	39,30	65,3	128,4	335,3	361,4	619,2	918
8A	73,20		152,9	305,8	343,5	727,7	1058
8B	74,56		119,3	243,2	367,3	805,4	1194
8C	65,06		140,4	345,6	366,9	775,5	1346
Gjennomsnitt (nM)	57	67	154	361	426	815	1217
SD	16	19	30	62	73	109,49	176
<b>RSD (%)</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>20</b>	<b>17</b>	<b>17</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>103</b>	<b>93</b>	<b>108</b>	<b>101</b>	<b>107</b>	<b>102</b>	<b>101</b>

**Tabell 44: Intermediær presisjon og nøyaktighet for 3-MT undersøkt ved analyse av åtte standarder i tre løsningsreplikater over åtte analyseserier. Alle konsentrasjoner er gitt i nM.**

	3-MT							
	Nivå 1	Nivå 2	Nivå 3	Nivå 4	Nivå 5	Nivå 6	Nivå 7	Nivå 8
<b>Teoretisk Verdi (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,77</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>
<b>Dag</b>								
1A	0,8429	0,6731	1,252	1,914	5,638	24,78	48,14	73,15
1B	0,4462	0,9594	0,8878	2,276	5,075	24,13	50,75	66,21
1C	0,4999	0,5483	0,6456	2,526	3,950	24,33	43,62	67,98
2A	0,7019	0,8663		1,974	5,062	21,99	43,63	60,39
2B	0,4460	0,8013		2,174	5,104	21,70	41,04	60,36
2C	0,5605	0,7064		2,103	5,603	20,33	42,63	59,68
3A	0,7490	0,5553	0,9946	1,539	4,539	19,58	39,58	56,95
3B	0,5246	0,6939	0,6887	2,298	4,973	20,07	36,80	53,68
3C	0,3773	0,6211	0,5887	1,580	5,001	20,98	40,86	54,07
4A	0,4616	1,0188	0,8485	2,458	4,669	23,02	46,81	63,77
4B	0,5106	0,5419	1,347	2,241	4,838	23,52	46,96	70,45
4C	0,7364	0,6164	1,185	2,082	5,234	22,57	49,93	67,61
5A	0,4570	0,6806	0,8833	2,015	5,019	22,13	45,33	67,79
5B	0,5084	0,6637	0,8496	1,902	5,361	21,95	45,43	62,03
5C	0,5013	0,8163	1,077	2,131	5,723	22,18	42,79	63,16
6A	0,4924	0,9132	1,205	1,954	5,311	21,89	42,21	65,49
6B	0,4825	0,7167	1,268	1,828	5,139	23,02	38,70	59,81
6C	0,3708	0,8697	1,173	2,320	5,080	20,48	40,23	65,83
7A	0,3599	0,6087	0,9843	1,384	4,520	20,16	43,02	64,16
7B	0,6971	0,6899	0,8204	1,835	4,205	19,77	41,97	61,41
7C	0,5537	0,5194	0,7981	1,706	4,310	19,68	37,03	59,12
8A	0,1989	0,7537		1,835	6,108	24,83	50,25	65,75
8B	0,3469	0,4863		1,835	5,915	24,25	57,37	61,41
8C	0,1715	0,6744		2,404	4,985	28,63	51,80	61,41
<b>Gjennomsnitt (nM)</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>0,97</b>	<b>2,0</b>	<b>5,1</b>	<b>22</b>	<b>44</b>	<b>63</b>
<b>SD</b>	<b>0,16</b>	<b>0,14</b>	<b>0,23</b>	<b>0,30</b>	<b>0,53</b>	<b>1,7</b>	<b>4,9</b>	<b>4,9</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>32</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>8</b>
<b>Bias (%)</b>	<b>100</b>	<b>92</b>	<b>97</b>	<b>101</b>	<b>101</b>	<b>110</b>	<b>110</b>	<b>105</b>



### 6.4.3 Matrikseffekter

Matrikseffekter ble undersøkt ved tilsetning av neurotransmittere til Ringers løsning, mikrodialysat og maursyre (tabell 45 og 46).

**Tabell 45: Gjennomsnittlig matrikseffekt for analytt og IS for tre replikater ved tre konsentrasjonsnivåer av spiket Ringers løsning mot mobilfase.**

<b>5-HT</b>	Kons. (nM)	5,0	40	60	<b>NE</b>	Kons. (nM)	129	240	360
	ME(%) analytt	109	100	97		ME(%) analytt	31	53	39
	SD analytt	18	6,8	0,8		SD analytt	22	10	13
	RSD analytt (%)	16	6,8	0,8		RSD analytt (%)	72	19	33
	ME(%) IS	94	91	95		ME(%) IS	46	36	35
	SD IS	1,7	4,8	3,7		SD IS	13,1	1,5	1,0
	RSD IS (%)	1,8	5,2	3,9		RSD IS (%)	28	4,1	2,8
	Korrigert ME (%)	116	110	102		Korrigert ME (%)	71	147	113
<b>5-HIAA</b>	Kons. (nM)	79	800	1200	<b>Ach</b>	Kons. (nM)	5,0	40	60
	ME(%) analytt	107	106	103		ME(%) analytt	114	125	121
	SD analytt	5,1	2,4	0,9		SD analytt	9,2	4,2	2,5
	RSD analytt (%)	4,8	2,3	0,9		RSD analytt (%)	8,1	3,4	2,0
	ME(%) IS	101	96	100		ME(%) IS	67	72	76
	SD IS	6,4	5,1	4,8		SD IS	2,6	5,1	3,4
	RSD IS (%)	6,3	5,3	4,8		RSD IS (%)	3,9	7,0	4,4
	Korrigert ME (%)	106	110	103		Korrigert ME (%)	170	173	158
<b>DA</b>	Kons. (nM)	5,0	40,0	60,0	<b>Glu</b>	Kons. (nM)	143	357	-
	ME(%) analytt	75	83	81		ME(%) analytt	3,5	3,3	-
	SD analytt	10,5	1,8	2,1		SD analytt	0,3	0,1	-
	RSD analytt (%)	14,0	2,1	2,6		RSD analytt (%)	10	3,2	-
	ME(%) IS	67	72	76		ME(%) IS	46	36	-
	SD IS	2,6	5,1	3,4		SD IS	13	1,5	-
	RSD IS (%)	3,9	7,0	4,4		RSD IS (%)	28	4,1	-
	Korrigert ME (%)	111	115	107		Korrigert ME (%)	7,8	9,2	
<b>3-MT</b>	Kons. (nM)	5,0	40	60	<b>GABA</b>	Kons. (nM)	143	240	360
	ME(%) analytt	116	106	101		ME(%) analytt	41	30	28
	SD analytt	17	11	2,5		SD analytt	16	1,9	1,3
	RSD analytt (%)	14	11	2,5		RSD analytt (%)	39	6,5	4,8
	ME(%) IS	94	91	95		ME(%) IS	46	36	35
	SD IS	1,7	4,8	3,7		SD IS	13,1	1,5	1,0
	RSD IS (%)	1,8	5,2	3,9		RSD IS (%)	28,4	4,1	2,8
	Korrigert ME (%)	123	117	106		Korrigert ME (%)	87	83	80

**Tabell 46: Gjennomsnittlig matrikseffekt for tre replikater av spiket mikrodialysat og Ringers løsning ved to konsentrasjonsnivåer beregnet for analytt og IS.**

<b>5-HT</b>	Kons. (nM)	5	40	<b>NE</b>	Kons. (nM)	129	240
	ME analytt (%)	100	86		ME analytt (%)	33	21
	SD analytt	15	12		SD analytt	39	19
	RSD analytt	15	14		RSD analytt	118	91
	ME IS (%)	101	93		ME IS (%)	98	129
	SD IS	12	8,6		SD IS	6,3	46
	RSD IS	12	9,3		RSD IS	6,4	36
	IS korrigert ME	0,99	0,92		IS korrigert ME	0,35	0,19
	Korrigert ME (%)	103	104		Korrigert ME (%)	892	224
<b>5-HIAA</b>	Kons. (nM)	79	800	<b>ACh</b>	Kons. (nM)	357	800
	ME analytt (%)	303	97		ME analytt (%)	102	98
	SD analytt	7,6	11		SD analytt	8,0	3,8
	RSD analytt	2,5	11		RSD analytt	7,8	3,9
	ME IS (%)	97	85		ME IS (%)	74	72
	SD IS	13	12		SD IS	32	20
	RSD IS	13	14		RSD IS	43	28
	IS korrigert ME	3,1	1,1		IS korrigert ME	1,6	1,4
	Korrigert ME (%)	36	90		Korrigert ME (%)	99	94
<b>DA</b>	Kons. (nM)			<b>Glu</b>	Kons. (nM)	143	357
	ME analytt (%)	66	67,5		ME analytt (%)	98	103
	SD analytt	24	25,0		SD analytt	4,0	6,0
	RSD analytt	37	37,0		RSD analytt	4,1	5,8
	ME IS (%)	74	71,9		ME IS (%)	98	129
	SD IS	32	20,4		SD IS	6,3	46
	RSD IS	43	28,3		RSD IS	6,4	36
	IS korrigert ME	0,9	0,93		IS korrigert ME	1,0	0,9
	Korrigert ME (%)	122	99		Korrigert ME (%)	104	91
<b>3-MT</b>	Kons. (nM)	5,0	40	<b>GABA</b>	Kons. (nM)	143	240
	ME analytt (%)	97	99		ME analytt (%)	93	114
	SD analytt	8,9	1,8		SD analytt	3,3	28
	RSD analytt	9,1	1,8		RSD analytt	3,6	25
	ME IS (%)	101	93		ME IS (%)	98	129
	SD IS	12	8,6		SD IS	6,3	46
	RSD IS	12	9,3		RSD IS	6,4	36
	IS korrigert ME	1,0	1,1		IS korrigert ME	1,0	0,91
	Korrigert ME (%)	94	98		Korrigert ME (%)	117	101

## 6.4.4 Holdbarhet

Holdbarhet ble undersøkt i tre ulike løsningsmidler etter en dag på benk i romtemperatur, en uke i kjøleskap (4 °C), en uke i fryser (-20 °C) og tre dager i autoinjektor (6 °C). Holdbarheten ved de ulike betingelsene og statistiske beregninger er gitt i tabell 47-50. Det ble også undersøkt om korrekt kvantifisering var mulig dersom standarder etter tre dager i autoinjektor ble kvantifisert med en rekke standarder som også hadde stått tre dager i autoinjektor (tabell 51).

**Tabell 47: Oversikt over stoffenes gjennomsnittlige holdbarhet i fortynnet i tre ulike løsningsmidler (n=3) etter en dag på benk i romtemperatur.**

	Løsningsmiddel	Ringer			Askorbinsyre			Maursyre		
<b>5-HT</b>	Std.kons (nM)	5,0	50	100	5,0	50	100	5,0	50	100
	Gj.snitt. kons. t=0	4,8	57	115	4,8	51	98	5,0	48	103
	RSD (%)	6,9	4,0	2,8	2,6	11,9	8,5	9,6	1,6	7,2
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	5,1	58	112	5,2	54	107	4,6	50	106
	RSD (%)	6,1	5,9	3,0	5,4	3,1	3,2	6,0	2,9	2,5
	<b>Avvik %</b>	<b>7,1</b>	<b>1,4</b>	<b>-2,7</b>	<b>9,0</b>	<b>6,2</b>	<b>9,5</b>	<b>-7,1</b>	<b>3,0</b>	<b>3,3</b>
<b>5-HIAA</b>	Std.kons (nM)	25	250	500	25	250	500	25	250	500
	Gj.snitt. kons. t=0	30	249	504	29	215	425	28	220	449
	RSD (%)	7,4	3,8	3,4	2,2	12	6,4	11	2,4	1,0
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	23	268	573	29	265	535	4,2	170	431
	RSD (%)	6,1	5,9	3,0	5,4	3,1	3,2	6,0	2,9	2,5
	<b>Avvik %</b>	<b>7,1</b>	<b>1,4</b>	<b>-2,7</b>	<b>9,0</b>	<b>6,2</b>	<b>9,5</b>	<b>-7,1</b>	<b>3,0</b>	<b>3,3</b>
<b>DA</b>	Std.kons (nM)	5,0	50	100	5,0	50	100	5,0	50	100
	Gj.snitt. kons. t=0	5,1	53	109	4,9	47	92	5,1	46	93
	RSD (%)	3,9	8,3	3,6	10	8,3	16	17	5,2	4,1
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	2,0	55	109	4,9	55	106	4,1	50	105
	RSD (%)	7,3	6,6	6,7	12	1,9	1,4	19	4,5	3,9
	<b>Avvik %</b>	<b>-61</b>	<b>4,1</b>	<b>0,6</b>	<b>-0,2</b>	<b>17,0</b>	<b>18</b>	<b>-18</b>	<b>7,8</b>	<b>13,0</b>
<b>3-MT</b>	Std.kons (nM)	5,0	50	100	5,0	50	100	5,0	50	100
	Gj.snitt. kons. t=0	2,0	56	113	3,1	51	102	2,7	47	103
	RSD (%)	23	11	5,7	13	9,4	8,7	14	0,78	5,1
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	4,8	58	110	4,9	55	105	4,8	51	106
	RSD (%)	7,2	7,9	2,4	4,8	3,2	2,6	6,0	7,2	1,4
	<b>Avvik %</b>	<b>151,6</b>	<b>4,9</b>	<b>-2,7</b>	<b>57</b>	<b>6,6</b>	<b>3,6</b>	<b>81</b>	<b>6,5</b>	<b>3,6</b>
<b>NE</b>	Std.kons (nM)	25	250	500	25	250	500	25	250	500
	Gj.snitt. kons. t=0	-	401	746	42	278	498	0	179	351
	RSD (%)	-	58	26	22	21	12	173	19	30
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	-	173	353	69	239	491	44	175	265
	RSD (%)	-	28	28	21	6	12	12	13	34
	<b>Avvik %</b>	<b>-</b>	<b>36</b>	<b>-12</b>	<b>51</b>	<b>-21</b>	<b>23</b>	<b>-</b>	<b>3</b>	<b>43</b>
<b>ACh</b>	Std.kons (nM)	5,0	50	100	5,0	50	100	5,0	50	100
	Gj.snitt. kons. t=0	5,6	57	121	3,5	41	85	4,6	43	90
	RSD (%)	3,1	5,9	2,5	1,3	10	12	10	2,0	6,8
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	6,0	60	122	3,9	44	85	4,6	44	84
	RSD (%)	2,3	7,6	6,8	2,5	2,0	1,6	3,6	3,7	14
	<b>Avvik %</b>	<b>7,7</b>	<b>7,1</b>	<b>0,8</b>	<b>12,0</b>	<b>6,6</b>	<b>0,1</b>	<b>1,4</b>	<b>3,0</b>	<b>-6,7</b>
<b>GABA</b>	Std.kons (nM)	25	250	500	25	250	500	25	250	500
	Gj.snitt. kons. t=0	16	219	481	21	246	471	22	233	483

	Løsningsmiddel	Ringer			Askorbinsyre			Maursyre		
	RSD (%)	29	10	9,7	13	2,2	2,4	5,1	3,3	5,4
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	16	258	487	20	289	579	20	254	508
	RSD (%)	63	7,7	6,5	13	4,4	8,2	13	2,7	4,1
	<b>Avvik %</b>	<b>7,3</b>	<b>18,8</b>	<b>1,3</b>	<b>-4,5</b>	<b>17,0</b>	<b>22,9</b>	<b>-10,4</b>	<b>9,5</b>	<b>5,4</b>
<b>Glu</b>	Std.kons (nM)	50	500	1000	50	500	1000	50	500	1000
	Gj.snitt. kons. t=0	113	725	1562	572	5473	10691	700	7759	15510
	RSD (%)	10,1	18	17	5,0	7,0	4,2	17	2,2	3,0
	Gj.snitt. kons. t= 1 d	85	810	1533	514	4988	10935	661	6749	14778
	RSD (%)	49	2,7	14	4,9	1,7	6,8	7,4	3,1	14
	<b>Avvik %</b>	<b>-24</b>	<b>14</b>	<b>-1,5</b>	<b>-9,8</b>	<b>-8,6</b>	<b>2,6</b>	<b>-4,5</b>	<b>-13</b>	<b>-4,6</b>

-Kvantifisering ga 0 nM ved flere av konsentrasjonene, og det var ikke grunnlag til beregning.

Tabell 48: Oversikt over stoffenes gjennomsnittlige holdbarhet fortynnet i tre ulike løsningsmidler (n=3) etter en uke i kjøleskap ved 4 °C.

		Ringers løsning			Askorbinsyre			Maursyre		
<b>5-HT</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,4	45	66	4,9	43	63	4,7	41	65
	RSD (%)	3,2	3,9	4,6	2,8	7,4	2,1	14	2,6	4,2
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	4,3	44	73	5,1	42	59	4,4	37	64
	RSD (%)	17	1,9	7,5	11	0,75	11	4,6	29	4,5
	<b>Avvik %</b>	<b>-21</b>	<b>-1,7</b>	<b>21</b>	<b>3,8</b>	<b>-2,4</b>	<b>-7,7</b>	<b>-7,1</b>	<b>-10</b>	<b>-1,2</b>
<b>5-HIAA</b>	Std.kons (nM)	79	800	1200	79	800	1200	79	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	46	665	1098	50	625	1138	44	602	1067
	RSD (%)	7,5	7,9	4,4	3,4	9,1	4,6	4,0	1,2	2,6
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	26	791	1496	59	786	1186	15	425	1084
	RSD (%)	8,6	3,3	11,4	5,7	4,5	14	4,6	69	3,1
	<b>Avvik %</b>	<b>-43</b>	<b>19</b>	<b>36</b>	<b>18</b>	<b>26</b>	<b>4,2</b>	<b>-67</b>	<b>-29</b>	<b>1,6</b>
<b>DA</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,1	43	61	4,5	38	61	4,6	37	57
	RSD (%)	12	6,7	5,8	8,2	12	6,8	17	1,9	5,9
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	1,9	33	57	4,3	36	49	3,4	28	51
	RSD (%)	16	5,8	7,5	5,5	5,5	8,6	15	43	3,1
	<b>Avvik %</b>	<b>-62</b>	<b>-24</b>	<b>-6,5</b>	<b>-4,1</b>	<b>-6,0</b>	<b>-20</b>	<b>-27</b>	<b>-26</b>	<b>-11</b>
<b>3-MT</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,9	51	70	4,9	43	64	4,8	44	65
	RSD (%)	8,8	9,0	3,2	15	10	0,90	8,5	7,9	5,5
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	6,5	54	82	4,9	48	68	5,7	54	78
	RSD (%)	17	3,3	6,5	11	4,0	12	12	4,51	11
	<b>Avvik %</b>	<b>10</b>	<b>6,1</b>	<b>17</b>	<b>-0,09</b>	<b>13</b>	<b>6,3</b>	<b>18</b>	<b>23</b>	<b>19</b>
<b>NE</b>	Std.kons (nM)	129	240	360	129	240	360	129	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	103	198	291	203	251	317	92	151	230
	RSD (%)	18	7,0	25	16	5,3	4,0	34	7,3	6,3
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	95	169	261	121	202	278	66	97	198
	RSD (%)	28	28	13	28	12	9,4	23	32	19
	<b>Avvik %</b>	<b>-8</b>	<b>-15</b>	<b>-10</b>	<b>-40</b>	<b>-19</b>	<b>-12</b>	<b>-28</b>	<b>-35</b>	<b>-14</b>
<b>ACh</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,3	47	61	2,9	26	37	3,1	27	39
	RSD (%)	4,3	3,4	4,2	9,7	12,3	2,64	6,86	0,43	7,4

		Ringers løsning			Askorbinsyre			Maursyre		
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	5,9	50,0	75,4	4,0	40,2	53	4,7	41	57
	RSD (%)	8,5	2,8	4,9	5,0	2,1	9,0	7,9	2,7	3,9
	<b>Avvik %</b>	<b>12</b>	<b>7,6</b>	<b>23</b>	<b>38</b>	<b>57</b>	<b>40</b>	<b>54</b>	<b>53</b>	<b>46</b>
<b>Glu</b>	Std.kons (nM)	357	800	1200	357	800	1200	357	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	305	645	-	3309	6785	-	2959	6175	-
	RSD (%)	9,3	4,4	-	1,9	6,7	-	15	3,6	-
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	278	583	-	1999	4424	-	2234	4909	-
	RSD (%)	5,8	5,5	-	8,8	2,5	-	3,2	3,3	-
	<b>Avvik %</b>	<b>-8,9</b>	<b>-9,6</b>	<b>-</b>	<b>-40</b>	<b>-35</b>	<b>-</b>	<b>-25</b>	<b>-21</b>	<b>-</b>
<b>GABA</b>	Std.kons (nM)	143	240	360	143	240	360	143	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	130	226	320	166	292	406	150	274	403
	RSD (%)	7,3	6,2	6,2	6,9	7,6	1,7	3,4	4,3	4,2
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	122	214	310	149	252	364	145	232	352
	RSD (%)	2,0	6,6	8,4	6,6	2,3	3,7	3,5	4,2	3,2
	<b>Avvik %</b>	<b>-5,8</b>	<b>-5,3</b>	<b>-3,0</b>	<b>-10</b>	<b>-14</b>	<b>-10</b>	<b>-3,8</b>	<b>-15</b>	<b>-13</b>

-Glu ble ikke tilsatt standardene og ble derfor ikke målt

Tabell 49: Oversikt over stoffenes gjennomsnittlige holdbarhet fortynnet i tre ulike løsningsmidler (n=3) etter en uke i fryser ved -20 °C.

		Ringers løsning			Askorbinsyre			Maursyre		
<b>5-HT</b>	Std.kons (nM)	5	40	60	5	40	60	5	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,4	45	66	4,9	43	63	4,7	41	65
	RSD (%)	3,2	3,9	4,6	2,8	7,4	2,1	14	2,6	4,2
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	0,27	25	45	0,4	19	44	2,5	29	51
	RSD (%)	50	25	33	55	21	13	84	38	37
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-95</b>	<b>-44</b>	<b>-26</b>	<b>-91</b>	<b>-56</b>	<b>-30</b>	<b>-46</b>	<b>-29</b>	<b>-21</b>
<b>5-HIAA</b>	Std.kons (nM)	79	800	1200	79	800	1200	79	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	46	665	1098	50	625	1138	44	602	1067
	RSD (%)	7,5	7,9	4,4	3,4	9,1	4,6	4,0	1,2	2,6
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	4,7	536	987	6,8	427	1073	27	521	990
	RSD (%)	40	24	30	16	22	13	100	36	37
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-90</b>	<b>-19</b>	<b>-10</b>	<b>-86</b>	<b>-32</b>	<b>-5,7</b>	<b>-39</b>	<b>-14</b>	<b>-7</b>
<b>DA</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,1	43	61	4,5	38	61	4,6	37	57
	RSD (%)	12	6,7	5,8	8,2	12	6,8	17	1,9	5,9
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	3,1	25	41	3,7	29	48	3,2	23	37
	RSD (%)	21	8,2	8,7	6,9	16	14	22	38	44
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-41</b>	<b>-43</b>	<b>-33</b>	<b>-18</b>	<b>-24</b>	<b>-21</b>	<b>-32</b>	<b>-39</b>	<b>-36</b>
<b>3-MT</b>	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5,0	40	60	5,0	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,9	51	70	5	43	64	5	44	65
	RSD (%)	8,8	9,0	3,2	15	10	0,90	8,5	7,9	5,5
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	7,9	60	80	6,1	48	88	5,7	43	66
	RSD (%)	26	24	26	4,5	20	9,4	42	38	28
	<b>Avvik (%)</b>	<b>35</b>	<b>18</b>	<b>31</b>	<b>25</b>	<b>12</b>	<b>39</b>	<b>19</b>	<b>-1,5</b>	<b>0,41</b>
<b>NE</b>	Std.kons (nM)	128,6	240	360	129	240	360	128,6	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	103	198	291	203	251	317	92	151	230
	RSD (%)	18	7,0	25	16	5	4,0	34	7,3	6,3
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	85	212	199	121	180	234	71	96	135
	RSD (%)	16	20	6	12	29	14	16	15	44
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-17</b>	<b>7,4</b>	<b>-31</b>	<b>-41</b>	<b>-28</b>	<b>-26</b>	<b>-23</b>	<b>-36</b>	<b>-41</b>

		Ringers løsning			Askorbinsyre			Maursyre		
ACh	Std.kons (nM)	5,0	40	60	5	40	60	5	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	5,3	47	61	2,9	26	37	3,1	27	39
	RSD (%)	4,3	3,4	4,2	10	12	2,6	7	0,43	7,4
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	6,2	51	68	3,6	31	50	3,5	30	43
	RSD (%)	2,8	9,0	8,5	12	17	11	29	37	41
	<b>Avvik (%)</b>	<b>18</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>22</b>	<b>32</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>10</b>
GABA	Std.kons (nM)	142,9	240	360	143	240	360	142,9	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	130	226	320	166	292	406	150	274	403
	RSD (%)	7,3	6,2	6,2	6,9	7,6	1,7	3,4	4,3	4,2
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	124	202	257	136	205	311	105	174	230
	RSD (%)	3,5	13	13	4,2	17	4,8	34	43	37
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-4,8</b>	<b>-11</b>	<b>-20</b>	<b>-18</b>	<b>-30</b>	<b>-23</b>	<b>-30</b>	<b>-36</b>	<b>-43</b>
Glu	Std.kons (nM)	357,1	800	1200	357	800	1200	357,1	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	305	645	-	3309	6785	-	2959	6175	-
	RSD (%)	9,3	4,4	-	1,9	6,7	-	15	3,6	-
	Gj.snitt. kons. t= 7 d	285	562	-	1967	3852	-	1769	3991	-
	RSD (%)	10	13	-	16	15	-	30	36	-
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-6,4</b>	<b>-13</b>	<b>-</b>	<b>-41</b>	<b>-43</b>	<b>-</b>	<b>-40</b>	<b>-35</b>	<b>-</b>

-Glu ble ikke tilsatt standardene og ble derfor ikke målt

Tabell 50: Oversikt over stoffenes gjennomsnittlige holdbarhet i Ringers løsning (n=3) etter tre dager i autoinjektor ved 6 °C.

5-HT	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,65	0,73	0,96	1,9	5,4	24	47	69
	RSD (%)	25	15	25	9,4	2,8	7,2	8,3	2,7
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,48	0,91	1,0	2,6	7,0	27	51	79
	RSD (%)	4,6	26	24	7,0	11	4,2	2,7	3,3
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-23</b>	<b>29</b>	<b>16</b>	<b>38</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>9,3</b>	<b>14</b>
5-HIAA	Std.kons (nM)	7,9	12	16	31	79	400	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	11	13	15	30	69	480	950	1384
	RSD (%)	20	5,5	2,7	2,8	5,9	3,6	8,3	5,9
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	22	23	28	62	159	1009	2010	3054
	RSD (%)	46	2,9	3,0	6,8	5,4	2,1	1,6	2,7
	<b>Avvik (%)</b>	<b>127</b>	<b>78</b>	<b>85</b>	<b>104</b>	<b>130</b>	<b>111</b>	<b>113</b>	<b>121</b>
DA	Std.kons (nM)	0,5	0,77	1	2	5	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,76	0,85	1,1	2,1	5,0	20	43	62
	RSD (%)	6,7	17	23	6,0	4,6	5,6	14	12
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,62	0,93	0,71	2,3	5,1	23	44	68
	RSD (%)	21	29	11	19	16	2,8	12	2,7
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-17</b>	<b>8,1</b>	<b>-33</b>	<b>6,6</b>	<b>3,5</b>	<b>12</b>	<b>5,4</b>	<b>10</b>
3-MT	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,76	0,83	1,1	1,8	4,4	19	39	58
	RSD (%)	21	10	9,0	10	2,5	1,3	7,8	4,1
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,58	0,94	1,5	3,3	7,5	30	59	89
	RSD (%)	68	13	35	5,6	11	2,4	1,6	6,3
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-23</b>	<b>16</b>	<b>40</b>	<b>80</b>	<b>70</b>	<b>56</b>	<b>52</b>	<b>52</b>
NE	Std.kons (nM)	13	20	26	51	129	120	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	-	-	-	79	176	118	279	408
	RSD (%)	-	-	-	37	37	34	40	10
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	-	-	-	0,0	11,5	38	229	394

	RSD (%)	-	-	-	-	90	112	61	32
	<b>Avvik (%)</b>	-	-	-	<b>-100</b>	<b>-92</b>	<b>-72</b>	<b>-11</b>	<b>-4,0</b>
<b>ACh</b>	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,40	0,75	0,91	2,1	5,7	23	48	70
	RSD (%)	18	6	6,1	6	3,3	7,1	14	9,7
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	1,7	1,5	2,0	3,2	7,0	28	49	78
	RSD (%)	51	11	9	5,5	4	6,9	10	4,3
	<b>Avvik (%)</b>	<b>341</b>	<b>102</b>	<b>117</b>	<b>54</b>	<b>24</b>	<b>23</b>	<b>5,1</b>	<b>12</b>
<b>GABA</b>	Std.kons (nM)	14	22	28,6	57,1	143	120	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	17	26	28	55	140	103	218	304
	RSD (%)	32	6,4	13	7,1	19	9,0	8,5	6,9
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	7,5	10	14	53	154	101	217	400
	RSD (%)	43	80	45	29	6,9	24	14	12
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-50</b>	<b>-62</b>	<b>-49</b>	<b>-1,3</b>	<b>13</b>	<b>-2,5</b>	<b>-0,50</b>	<b>31</b>
<b>Glu</b>	Std.kons (nM)	36	55	71,5	142,9	357	400	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	36	52	57	125	334	327	706	945
	RSD (%)	26	27	20	22	1,2	8,0	12	8,1
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	65	97	126	152	405	434	802	1154
	RSD (%)	15	15	32	40	5,1	19	12	6,2
	<b>Avvik (%)</b>	<b>88</b>	<b>95</b>	<b>125</b>	<b>24</b>	<b>21</b>	<b>32</b>	<b>14</b>	<b>23</b>

-Kvantifisering ga 0 nM ved flere av konsentrasjonene, og det var ikke grunnlag til beregning.

Tabell 51: Avvik mellom konsentrasjoner målt etter tre dager i autoinjektor ved 6 °C kvantifisert med hhv. ferske standarder og standardene etter tre dager i autoinjektor ved 6 °C.

<b>5-HT</b>	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,65	0,73	1,0	1,9	5,4	24	47	69
	RSD (%)	25	15	25	9,4	2,8	7,2	8,3	2,7
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,6	0,9	1,0	2,2	5,6	20	39	60
	RSD (%)	2,7	19	19	6,3	10	4,2	2,6	3,2
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-4,2</b>	<b>30</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>2,9</b>	<b>-13</b>	<b>-17</b>	<b>-13</b>
<b>5-HIAA</b>	Std.kons (nM)	7,9	12	16	31	79	400	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	11	13	15	30	69	480	950	1384
	RSD (%)	20	5,5	2,7	2,8	5,9	3,6	8,3	5,9
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	11	11	14	27	67	412	819	1243
	RSD (%)	37	2,3	2,5	6,2	5,2	2,1	1,6	2,7
	<b>Avvik (%)</b>	<b>15</b>	<b>-10</b>	<b>-10</b>	<b>-10</b>	<b>-3,2</b>	<b>-14</b>	<b>-13</b>	<b>-10</b>
<b>DA</b>	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,76	0,85	1,1	2,1	5,0	20	43	62
	RSD (%)	6,7	17	23	6,0	4,6	5,6	14	12
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,7	1,0	0,8	2,0	4,3	18	35	54
	RSD (%)	14	22	7,8	16	15	2,7	12	2,7
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-1,2</b>	<b>16</b>	<b>-23</b>	<b>-3,9</b>	<b>-13</b>	<b>-10</b>	<b>-16</b>	<b>-13</b>
<b>3-MT</b>	Std.kons (nM)	0,5	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,8	0,8	1,1	1,8	4,4	19	39	58
	RSD (%)	21	10	9,0	10	2,5	1,3	7,8	4,1
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,7	0,9	1,3	2,6	5,7	22	43	65

	RSD (%)	43	10	28	5,0	10	2,4	1,5	6,5
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-9,5</b>	<b>15</b>	<b>26</b>	<b>45</b>	<b>29</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>11</b>
<b>NE</b>	Std.kons (nM)	13	20	26	51	129	120	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	0	0	0	79	176	118	279	408
	RSD (%)	-	-	-	37	37	34	40	10
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0	0	0	0	122	200	366	508
	RSD (%)	-	-	-	-	87	19	33	21
	<b>Avvik (%)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-100</b>	<b>-25</b>	<b>76</b>	<b>43</b>	<b>24</b>
<b>ACh</b>	Std.kons (nM)	0,50	0,77	1,0	2,0	5,0	20	40	60
	Gj.snitt. kons. t=0	0,40	0,75	0,9	2,1	5,7	23	48	70
	RSD (%)	18	5,7	6,1	6,4	3,3	7,1	14	10
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	0,57	0,18	0,60	1,7	5,3	25	44	71
	RSD (%)	111	84	28	9,3	5,1	7,2	11	4,4
	<b>Avvik (%)</b>	<b>47</b>	<b>-76</b>	<b>-34</b>	<b>-16</b>	<b>-6,8</b>	<b>8,9</b>	<b>-5,0</b>	<b>1,8</b>
<b>GABA</b>	Std.kons (nM)	14	22	29	57	143	120	240	360
	Gj.snitt. kons. t=0	17	26	28	55	140	103	218	304
	RSD (%)	32	6,4	13	7,1	19	9,0	8,5	6,9
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	45	47	49	80	158	117	206	347
	RSD (%)	5,5	13	10	15	5,2	16	12	11
	<b>Avvik (%)</b>	<b>187</b>	<b>82</b>	<b>77</b>	<b>47</b>	<b>15</b>	<b>13</b>	<b>-5,5</b>	<b>14</b>
<b>Glu</b>	Std.kons (nM)	36	55	71	143	357	400	800	1200
	Gj.snitt. kons. t=0	36	52	57	125	334	327	706	945
	RSD (%)	26	27	20	22	1,2	8,0	12	8,1
	Gj.snitt. kons. t= 3 d	45	71	94	115	319	342	639	922
	RSD (%)	17	16	35	43	5,3	19	12	6,2
	<b>Avvik (%)</b>	<b>31</b>	<b>42</b>	<b>68</b>	<b>-6,3</b>	<b>-4,5</b>	<b>4,0</b>	<b>-9,3</b>	<b>-2,0</b>

-Kvantifisering ga 0 nM ved flere av konsentrasjonene, og det var ikke grunnlag til beregning.



## 6.5 Beregninger og statistikk for validering av analyse av hjernevev

Dette kapitlet inneholder rådata og statistiske beregninger fra valideringen av analyse av hjernevev.

### 6.5.1 Repeterbarhet

Repetierbarhet ble bestemt ved analyse av ni standarder i ti løsningsreplikater. Målingene av standardløsningen med lavest konsentrasjon viste mangelfull respons for alle analyttene og beregninger ble derfor ikke utført for denne. Repeterbarheten for de åtte resterende standardene er gitt i tabell 52.

Tabell 52: Repeterbarhet og nøyaktighet for analyse av hjernevev.

Analytt		S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9
5-HT	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gj.snitt (nM)	0,75	1,3	2,5	5,1	17,8	428,8	942,6	2219
	RSD (%)	37	44	31	20	13	14	7,4	6,4
	Bias (%)	100	86	83	85	89	86	94	92
5-HIAA	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	8,4	9,5	13	381	912	2530
	RSD (%)	-	-	12,6	15,1	17,0	8,1	8,5	14
	Bias (%)	-	-	281	159	64	76	91	105
DA	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	0,85	1,5	3,1	4,9	17	432	945	2230
	RSD (%)	39	26	13	8,4	16	14	5,7	7,2
	Bias (%)	113	101	103	82	85	86	95	93
HVA	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	-	-	217	536	1568
	RSD (%)	-	-	-	-	-	36	21	20
	Bias (%)	-	-	-	-	-	43	54	65
DOPAC	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	33	24	215	487	1125
	RSD (%)	-	-	-	23	1,6	18	15	13
	Bias (%)	-	-	-	111	121	43	49	47
NE	Teoretisk (nM)	6,1	12	24	49	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	5,8	11	21	42	18	429	928	2349
	RSD (%)	16	12	13	12	16	15	6,7	6,5
	Bias (%)	94	88	84	87	90	86	93	98
ACh	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	0,92	2,1	4,7	17	455	997	2276
	RSD (%)	-	18	15	15	16	15	5,7	7,5
	Bias (%)	-	62	71	79	85	91	100	95
Glu	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	40	1000	2000	4800
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	10	23	33	883	1867	4566
	RSD (%)	-	-	8,9	18	24	15	6,0	6,1
	Bias (%)	-	-	68	77	82	88	93	95
GABA	Teoretisk (nM)	7,5	15,1	30,2	60,3	40	1000	2000	4800
	Gjennomsnitt (nM)	8,9	16	29	51	39	881	1932	4901
	RSD (%)	8,5	20	12	9,7	14	13	5,7	6,1
	Bias (%)	118	107	97	84	97	88	97	102
	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	2,4	18	473	983	2062

Analytt		S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9
3-MT	RSD (%)	-	-	-	38	9,7	14	6,5	5,7
	Bias (%)	-	-	-	40	88	95	98	86

-Kvantifisering ga 0 nM ved flere av konsentrasjonene, og det var ikke grunnlag til beregning.

## 6.5.2 Intermediær presisjon og nøyaktighet

Intermediær presisjon og nøyaktighet ble bestemt ved analyse av ni standardløsninger i tre replikater over fem analyseserier. Målingene av standardløsningen med lavest konsentrasjon viste mangelfull respons for alle analyttene og beregninger ble derfor ikke utført for denne. Repeterbarheten for de åtte resterende standardene er gitt i tabell 53.

Tabell 53: Intermediær presisjon og nøyaktighet for analyse av hjernevev.

Analytt		S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9
5-HT	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	0,72	1,1	2,8	5,3	19	521	1055	2396
	RSD (%)	92	50	30	19	17	9,9	4,8	6,0
	Bias (%)	96	76	93	88	97	104	105	100
5-HIAA	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	7	17	462	971	2489
	RSD (%)	-	-	-	60	19	12	8,1	11
	Bias (%)	-	-	-	114	86	92	97	104
DA	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	0,75	1,2	2,4	6,0	18	476	964	2234
	RSD (%)	76	54	36	28	10,1	7,7	6,4	8,1
	Bias (%)	100	82	79	100	90	95	96	93
HVA	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	-	-	351	899	2220
	RSD (%)	-	-	-	-	-	76	47	36
	Bias (%)	-	-	-	-	-	70	90	93
DOPAC	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	50	40	420	804	1949
	RSD (%)	-	-	-	43	48	31	20	18
	Bias (%)	-	-	-	167	202	84	80	81
NE	Teoretisk (nM)	6,1	12,2	24,5	48,9	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	8	11	20	46	17	483	987	2404
	RSD (%)	72	41	36	16	25	12	5	9
	Bias (%)	126	91	81	93	83	97	99	100
ACh	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3	6	20	500	1000	2400
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	2	4,9	20	544	1055	2227
	RSD (%)	-	-	34	21	18	13	14	14
	Bias (%)	-	-	74	82	99	109	106	93
Glu	Teoretisk (nM)	3,7	7,4	14,8	29,7	40	1000	2000	4800
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	8,0	24	33	997	1970	4704
	RSD (%)	-	-	47	19	18	6,5	4,1	8,4
	Bias (%)	-	-	54	82	83	100	99	98
GABA	Teoretisk (nM)	7,5	15,1	30,2	60,3	40	1000	2000	4800
	Gjennomsnitt (nM)	9,0	14	29	54	40	973	2006	4898
	RSD (%)	28	16	15	10	14	6	4	6

Analytt		S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9
	Bias (%)	120	95	97	90	99	97	100	102
3-MT	Teoretisk (nM)	0,75	1,5	3,0	6,0	18	476	964	2234
	Gjennomsnitt (nM)	-	-	-	3,6	20	533	1071	2338
	RSD (%)	-	-	-	36,4	9,4	7,2	5,3	8,9
	Bias (%)	-	-	-	60	98	107	107	97

-Kvantifisering ga 0 nM ved flere av konsentrasjonene og det var ikke grunnlag til beregning.

## 6.6 Reelle prøver

Dette kapitlet gir en oversikt over målte konsentrasjoner og statistiske beregninger fra analyse av mikrodialysat og hjernevev.

### 6.6.1 Analyse av mikrodialysatprøver

Mikrodialyse av en rotte eksponert for 6-MAM ble utført i hjerneområdene VTA og NAc. De beregnede konsentrasjonene av neurotransmitter og metabolitter er gitt i tabell 54 og 55.

**Tabell 54: Konsentrasjoner av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter målt i VTA. Konsentrasjonene målt før t=0 tilsvarer basalnivå.**

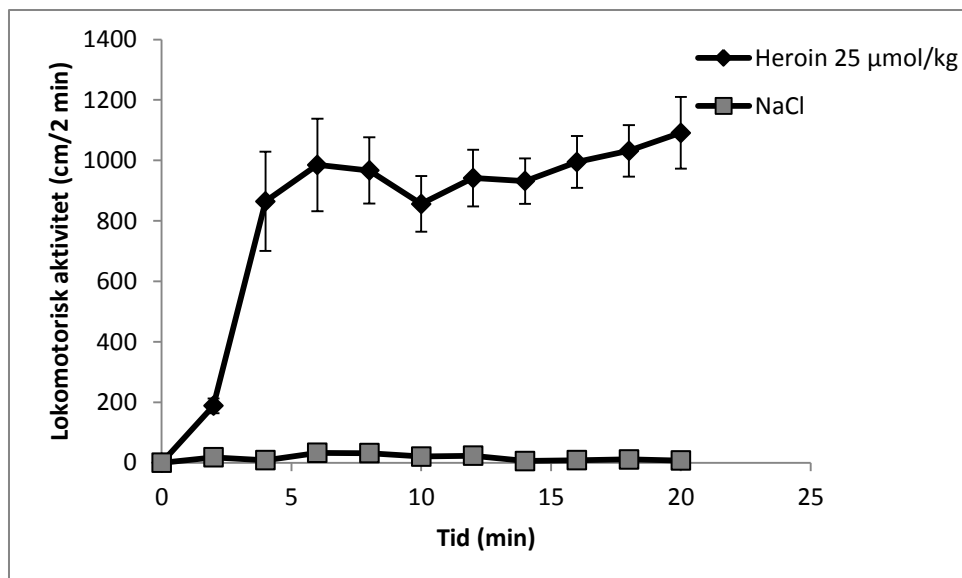
Prøve	Tid (min)	5-HT	5-HIAA	DA	NE	ACh	Glu	GABA	3-MT
VTA 1	-30	2,7	280	0,39	1451	0,05	1145	51,2	0,59
VTA 2	-25	2,6	242	0,41	3422	0,09	1826	42,2	0,37
VTA 3	-20	2,5	233	0,25	947	0,16	508	40,6	0,55
VTA 4	-15	2,6	262	0,26	918	0,07	437	35,3	0,49
VTA 5	-10	2,6	224	0,30	713	0,03	349	36,0	0,33
VTA 6	-5	2,8	272	0,25	895	0,07	463	34,2	0,55
VTA 7	0	2,5	251	0,21	1154	0,04	466	37,7	0,50
VTA 8	5	2,4	266	0,27	1364	0,05	547	46,2	0,46
VTA 9	10	2,6	251	0,27	703	0,05	480	31,7	0,55
VTA 10	15	2,5	255	0,41	1631	0,02	838	34,0	0,37
VTA 11	20	2,7	406	0,37	688	0,05	730	47,1	1,0
VTA 12	25	3,4	1563	0,42	794	0,04	744	47,4	3,0
VTA 13	30	2,5	260	0,31	792	0,06	621	44,5	0,54
VTA 14	35	2,5	285	0,36	975	0,04	668	37,0	0,48
VTA 15	40	2,9	450	0,50	914	0,04	517	34,0	0,83
VTA 16	45	2,6	345	0,31	973	0,03	588	39,5	0,83
VTA 17	50	3,0	361	0,46	668	0,04	481	29,8	0,85
VTA 18	55	2,7	313	0,32	841	0,02	442	32,2	0,71
VTA 19	60	2,7	351	0,23	1193	0,02	436	31,1	0,76
VTA 20	65	2,7	376	0,32	858	0,03	351	34,1	1,0

**Tabell 55: Konsentrasjoner neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter målt i NAc. Konsentrasjonene målt før t=0 tilsvarer basalnivå.**

Prøve	Tid	5-HT	5-HIAA	DA	NE	ACh	Glu	GABA	3-MT
NAc 1	-30	2,6	579	0,55	4243	0,14	3769	136	0,73
NAc 2	-25	2,5	489	0,43	6904	0,18	16580	107	0,46
NAc 3	-20	2,5	394	0,38	3927	0,20	7219	101	0,32
NAc 4	-15	2,5	423	0,41	3937	0,17	3051	91	0,77
NAc 5	-10	2,5	379	0,30	4222	0,15	4357	87	0,61
NAc 6	-5	2,5	349	0,38	3466	0,22	5403	93	0,28
NAc 7	0	3,3	1695	0,50	3646	0,24	3455	93	3,0
NAc 8	5	2,4	380	0,43	2542	0,19	3684	95	0,38
NAc 9	10	2,5	519	0,36	1821	0,18	2782	85	0,41
NAc 10	15	2,5	330	0,31	3016	0,17	2381	93	0,39
NAc 11	20	2,6	751	0,57	3102	0,15	2124	95	1,4
NAc 12	25	2,7	314	0,44	2086	0,12	1667	79	0,70
NAc 13	30	3,1	735	0,94	2881	0,17	3101	96	0,97
NAc 14	35	2,4	369	0,56	3265	0,26	4799	96	0,78
NAc 15	40	2,6	395	0,49	2013	0,23	1564	94	0,26
NAc 16	45	2,5	402	0,42	1967	0,14	1102	67	0,52
NAc 17	50	2,5	422	0,49	2177	0,21	1370	102	1,1
NAc 18	55	2,5	429	0,59	2389	0,23	880	95	0,65
NAc 19	60	2,4	450	0,46	2042	0,13	1104	94	0,46
NAc 20	65	2,5	379	0,56	1490	0,08	828	77	0,72

## 6.6.2 Analyse av hjernevevsprøver

Mus ble injisert med heroin (n=7) og NaCl (kontrollgruppe) (n=7) for å undersøke hvilken effekt rusmiddelet hadde på neurotransmitter- og metabolitnivåene. Målt lokomotorisk aktivitet er vist i figur 54. Konsentrasjonene målt i de ulike hjernedelene er gitt i tabell 56 og 57. Gjennomsnittlig konsentrasjon målt samt beregnet usikkerhet for de målte verdiene er gitt i tabell 58. Beregnet forholdstall mellom neurotransmittere og metabolitter er gitt i tabell 59.



Figur 54: Lokomotorisk aktivitet målt i mus eksponert for heroin og NaCl (gj.snitt +/- SEM, n=7) som funksjon av tid (forsøk utført av forsker Inger Lise Bogen, FHI og doktorgradsstipendiat Anne Marte Sjørnsen Kvellø, FHI).

Tabell 56: Konsentrasjoner av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter funnet i ulike hjernedeler fra rotter injisert med NaCl. Gråfargede ruter signaliserer uteliggere. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g hjernevev.

Prøve	5-HT	5-HIAA	DA	DOPAC	NE	ACh	Glu*	GABA*	3-MT
PFC 1	6	9,6	5,5	1,8	18	8,7	29455	4490	0,15
PFC 2	3,3	7,5	1	0,4	14	5,1	20661	3629	0,07
PFC 3	5	12	5,2	3,2	10	11	29307	5069	0,27
PFC 4	4,5	10	1,9	2,2	17	7,7	23986	5957	0,15
DS 1	4,2	33	87	134	2,6	11			5,4
DS 2	4	7,8	111	36	2	10			7,2
DS 3	4,6	10	101	35	3,5	14			6,1
DS 4	3,3	8,4	107	18	7,8	13			6,3
DS 5	4,1	10	117	14	3,6	18			11
DS 6	3,7	9,3	147	10	3,7	15			8,6
DS 7	4,1	10	144	17	5,2	16			6,5
NAC 1	0,82	1,7	9,1	3	1,5	0,93			0,63
NAC 2	0,53	1	5,6	3	0,69	0,93			0,23
NAC 3	0,68	1,6	6,2	4	1	1,38			0,38
NAC 4	0,51	1	7,3	2,8	0,23	0,77	2277	1192	0,26
NAC 5	0,72	1,2	7,9	1,5	2	1,2	2795	1859	0,28
NAC 6	0,6	1,1	5,6	3,2	0,37	0,62	2806	1581	0,42
NAC 7	0,4	0,9	4,6	0,85	0,42	0,35	1586	1485	0,12

\*Prøvene fra DS og enkelte NAC prøver ble ikke fortynnet og kunne ikke kvantifiseres.

**Tabell 57: Konsentrasjoner av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter funnet i ulike hjernedeler fra rotter injisert med heroin. Konsentrasjonene er gitt i nmol/g hjernevev.**

Prøve	5-HT	5-HIAA	DA	DOPAC	NE	ACh	Glu*	GABA*	3-MT
PFC 5	4,8	11	8,4	3,2	34	6,8	30108	4119	0,20
PFC 6	4,7	10	0,56	1,0	29	7,2	29688	4626	0,05
PFC 7	4,7	11	5,5	0,8	15	9,9	27061	5476	0,24
PFC 8	3,5	16	0,99	1,3	17	8,3	28607	5743	0,11
DS 8	4,1	8,1	77	26	2,5	9,9			3,1
DS 9	4,5	7,9	106	25	2,5	19,1			4,6
DS 10	4,3	11	109	39	3,4	17,4			4,8
DS 11	4,4	16	124	34	6,0	29,5			4,9
DS 12	4,6	15	95	29	5,9	14,4			4,2
DS 13	3,4	9,1	100	15	5,6	17,2			4,5
DS 14	6,1	12	141	17	6,4	23,0			4,8
NAC 8	0,82	1,8	11	5,8	1,1	0,92			0,38
NAC 9	0,76	1,8	8,0	6,1	0,72	1,35			0,35
NAC 10	0,90	1,8	5,9	4,2	2,4	2,17			0,27
NAC 11	0,75	1,4	5,4	4,5	0,68	1,7	2643	1336	0,08
NAC 12	0,29	0,57	2,9	1,0	0,15	0,3	1137	455	0,02
NAC 13	0,39	0,86	2,3	1,2	0,49	0,6	1413	900	0,01
NAC 14	0,47	0,95	4,9	3,5	0,28	0,8	1905	1088	0,08

\*Prøvene fra DS og enkelte NAC prøver ble ikke fortynnet og kunne ikke kvantifiseres.

Tabell 58: Gjennomsnittlige verdier av neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter målt i ulike hjernedeler med beregnet usikkerhet og p-verdi.

			5-HT	5-HIAA	DA	DOPAC	NE	ACh	Glu	GABA	3-MT
PFC	NaCl	Gj.snitt (nM/g)	4,7	9,9	3,4	1,9	15	8,0	2,6*10 <sup>4</sup>	4,8*10 <sup>3</sup>	0,16
		SD	1,1	2,0	2,3	1,2	3,5	2,2	4,3*10 <sup>3</sup>	9,8*10 <sup>2</sup>	0,08
		RSD(%)	24	20	68	61	24	28	17	20	50
	Heroin	Gj.snitt (nM/g)	4,4	12	3,9	1,6	24	8,0	2,9*10 <sup>4</sup>	4,9*10 <sup>3</sup>	0,2
		SD	0,60	2,8	3,8	1,1	9,1	1,4	1,4*10 <sup>3</sup>	7,5*10 <sup>2</sup>	0,09
		RSD(%)	14	24	97	69	39	17	5,0	15	59
		p-verdi (uparet)	0,71	0,32	0,83	0,71	0,12	0,99	0,23	0,75	0,88
		p-verdi (paret)	0,70	0,32	0,61	0,74	0,10	0,98	0,31	0,56	0,66
DS	NaCl	Gj.snitt (nM/g)	4,0	9,3	116	22	4,1	14			7,3
		SD	0,41	1,0	22	11	1,9	2,8			2,0
		RSD(%)	10	11	18,9	51	47	20			27
	Heroin	Gj.snitt (nM/g)	4,2	11	102	28	4,3	18			4,3
		SD	0,80	3,3	21	9	2	6			0,61
		RSD(%)	19	29	20	31	41	35			14
		p-verdi (uparet)	0,19	0,19	0,45	0,42	0,58	0,10			2,8*10 <sup>-3</sup>
		p-verdi (paret)	0,18	0,11	0,30	0,31	0,33	0,12			9,0*10 <sup>-3</sup>
NAC	NaCl	Gj.snitt (nM/g)	0,6	1,2	6,6	2,6	0,9	0,9	2366	1,5*10 <sup>3</sup>	0,3
		SD	0,14	0,30	1,5	1,0	0,65	0,34	576	2,8*10 <sup>2</sup>	0,17
		RSD(%)	23	25	23	40	73	39	24	18	50
	Heroin	Gj.snitt (nM/g)	0,6	1,3	5,8	3,8	0,8	1,1	1775	7,6*10 <sup>2</sup>	0,17
		SD	0,23	0,53	2,9	2,0	0,77	0,66	660	3,7*10 <sup>2</sup>	0,16
		RSD(%)	37	40	51	54	92	58	37	49	94
		p-verdi (uparet)	0,86	0,67	0,51	0,20	0,90	0,40	0,23	0,04	0,09
		p-verdi (paret)	0,50	0,17	0,50	0,06	0,58	0,36	0,35	0,17	0,08

Tabell 59: Gjennomsnittlig forholdstall mellom neurotransmittere og neurotransmittermetabolitter målt i ulike hjernedeler med beregnet usikkerhet.

	Hjernedel	PFC		DS		NAc	
	Injeksjon	NaCl	Heroin	NaCl	Heroin	NaCl	Heroin
<b>5-HIAA/5-HT</b>	Gj.snitt forholdstall	2,2	2,8	2,4	2,5	2,0	2,1
	RSD(%)	18	42	43	29	11	6,7
	p-verdi (uparet)	0,36		0,39		0,50	
	p-verdi (paret)	0,37		0,31		0,51	
<b>DOPAC/DA</b>	Gj.snitt forholdstall	0,64	0,92	0,19	0,25	0,40	0,63
	RSD(%)	58	85	61	36	41	28
	p-verdi (uparet)	0,55		0,31		$2,6 \cdot 10^{-2}$	
	p-verdi (paret)	0,53		0,28		$2,4 \cdot 10^{-2}$	
<b>3-MT/DA</b>	Gj.snitt forholdstall	$5,8 \cdot 10^{-2}$	$6,6 \cdot 10^{-2}$	$6,4 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-2}$	$4,9 \cdot 10^{-2}$	$2,4 \cdot 10^{-2}$
	RSD(%)	40	59	24	10	39	74
	p-verdi (uparet)	0,74		$3,0 \cdot 10^{-2}$		$2,5 \cdot 10^{-2}$	
	p-verdi (paret)	0,46		$4,7 \cdot 10^{-2}$		$2,9 \cdot 10^{-2}$	