



PREANALYTISK HÅLLBARHETSSTUDIE

IN VITRO BILDNING AV FOSFATIDYLETANOL I
BLODET

PREANALYTIC SUSTAINABILITY STUDY

IN VITRO FORMATION OF
PHOSPHATIDYLETHANOL IN BLOOD

Författare: **Elin Andersson**

Vårterminen 2018

Examensarbete: Grundnivå (G2E), 15 högskolepoäng

Huvudområde: Biomedicinsk laborietvetenskap

Biomedicinska analytikerprogrammet, inriktning laborietmedicin

BMLV, Examensarbete, 15 högskolepoäng

Institutionen för hälsotvetenskaper, Örebro universitet

Handledare: Cecilia Svelander, sjukhuskemist,
universitetssjukhuset Örebro.

Handledare: Paul Pettersson Pablo, ST-läkare,
Universitetssjukhuset Örebro.

Examinator: Malin Prenkert, lektor, Örebro universitet

ABSTRAKT

Studiens syfte var att undersöka hur den preanalytiska hanteringen kan påverka bildning av fosfatidyletanol (PEth) *in vitro* vid närvaro av alkohol i blodet vid provtagning. Två studier (studie 1 och 2) genomfördes, där 0,5 respektive 1,95 ‰ etanol spikades i blod från frivilliga försökspersoner. De spikade proven förvarades vid -23, 5 och 21 °C (studie 1) samt 5 och 21 °C (studie 2) i upp till 72 timmar. Prov upparbetades och analyserades med trippel quadrupol mass-spektrometri (LC-MS/MS) teknik.

Resultatet visade att PEth fortsatte bildas *in vitro* i samtliga förvaringstemperaturer om alkohol fanns i blodet. Prov som förvarats i rumstemperatur (21°C) hade ett något högre medelvärde av PEth jämfört med kylförvaring (5°C), men skillnaden var inte signifikant. Frysförvaring (-23°) gav snabb bildning av PEth och bör undvikas. Nuvarande anvisning, att kylförvara prov, bör bibehållas då en liten skillnad i medelvärde mellan kyl och rumstemperatur trots allt förelåg.

Nyckelord: Fosfatidyletanol, PEth-16:0/18:1, liquid chromatography, masspektrometri.

ABSTRACT

The purpose of the study was to study how the formation of phosphatidylethanol (PEth) was affected by storage in different temperatures with presence of alcohol in blood by time of sampling. Two studies (study 1 and study 2) were performed, where 0.5 and 1.95 ‰ ethanol respectively was added to blood from voluntary donors. Samples were stored in -23, 5 and 21 °C (study 1) and 5 and 21 °C (study 2) up to 72 hours. Samples were analysed with triple quadrupole mass-spectrometry (LC-MS/MS) technique.

Results showed that formation of PEth continued *in vitro* in all investigated/studied temperatures if ethanol was present in blood by time of sampling. Samples stored in room temperature (21°C) had a slightly higher mean value of PEth compared to storage in 5 °C, although the difference was not significant. Cryopreservation (-23 °C) showed a fast formation of PEth and should be avoided. Current instruction to store samples cold (5 °C) should be retained because of the small difference between storage in cold and room temperature that was observed.

Keywords: Phosphatidylethanol, PEth-16:0/18:1, liquid chromatography, mass spectrometry

INTRODUKTION

Fosfatidyletanol

Fosfatidylkolin är en molekyl som i blodet normalt spjälkas till fosfatidylsyra och kolin med hjälp av fosfolipas D. Vid närvaro av etanol leder istället samma spjälkning till bildning av fosfatidyletanol (PEth) och PEth i helblod används idag som en säker markör för alkoholintag. PEth som alkohol-markör anses ha en specificitet på 100% då molekylen endast bildas i närvaro av alkohol (etanol). Sensitiviteten för markören är väldigt hög (94-100%) vilket är beroende av den beslutsgräns som används (normal/riskkonsumtion) (1).

Inom svensk sjukvård används 0,05 $\mu\text{M/L}$ som lägsta rapporteringsvärde av PEth-16:0/18:1, värden under 0,05 $\mu\text{M/L}$ anses motsvara låg eller ingen alkoholkonsumtion. Värden mellan 0,05-0,3 $\mu\text{M/L}$ tyder på ett måttligt alkoholintag och värden över 0,3 $\mu\text{M/L}$ visar på överkonsumtion (2). Vid provtagning råds provtagare till att placera prov för PEth-analys i kyl direkt efter provtagning för att minimera eventuellt fortsatt bildning av PEth *in vitro*. Provtagare avråds även från att frysförvara prov enligt region Örebro läns nuvarande provtagningsanvisningar (3).

Analysmetoder

Tidigare analyserades PEth med UV-detektion, som endast mätte totala mängden PEth och ej kunde särskilja olika former av PEth. Idag används istället den mer specifika metoden masspektrometri som mäter separata PEth-former med betydligt lägre detektionsgräns. I den kliniska diagnostiken har man på nationell nivå kommit överens om att endast mäta PEth 16:0/18:1 som förekommer i hög koncentration i blodet och som avspeglar totalkoncentrationen på ett lämpligt sätt (2, 4-6). I studien mättes just denna form av PEth och det är den formen som avses i resultatet.

Masspektrometri

Masspektrometri (MS) fungerar genom att bestämma molekylmassa hos de analyter som analyseras. Metoden baseras på att laddade molekyler (joner) separeras och selekteras baserat på ration mellan sin molekylvikt (m) och laddning (z), alltså m/z . Då z oftast är 1 blir m/z i normalfallet detsamma som molekylvikten. MS-detektion kombineras ofta med gaskromatografi (GC) eller vätskekromatografi (LC) (7).

Masspektrometern består av en jonkälla, ett massfilter och en detektor, samt även datasystem för identifiering av prov. Prov (molekyler) förs in till jonkällan där jonisering sker, de bildade jonerna sorteras sedan i massfiltret utefter massa. I massfiltret råder vakuum för att jonerna ska kunna röra sig fritt utan att kollidera med luftmolekyler. Detektorn har en multiplikatoreffekt där elektroner frisätts från joner och jonströmmen omvandlas till en elektrisk signal som överförs till mjukvaran för avläsning (7).

Liquid chromatography – mass spectrometry (LC-MS) kombinerar vätskekromatografi med masspektrometri. En vanlig joniseringsmetod för LC-MS, som även använts i den här studien, är elektronspray-jonisering (ESI). Vid metoden förs elueringsmedelet innehållande provet genom en nål där en hög spänning och hög temperatur föreligger. Komponenterna blir då positivt eller negativt laddade beroende på spänningen och lämnar sedan nålspetsen som en ”spray”. Laddningstätheten i den bildade aerosolen ökar tills dropparna sprängs och jonerna hamnar i gasform. Ingången till massfiltret har motsatt spänning mot de bildade jonerna som därför dras mot denna (7).

I studien användes ett kvadropolmassfilter, som består av fyra poler (stavar) varav två är högpassfilter (+) och två är lågpassfilter (-) som genom inställning av spänning avgör vilken bestämd massa som kan passera filtret. Högpassfiltret attraherar joner med lägre massa än det som söks och lågpassfiltret drar till sig det motsatta och därmed kan endast den sökta massan passera filtret. Spänningen varierar så att olika jonmassor kan passera för detektion, men endast en massa åt gången (7). I studien har en så kallad trippelkvadropoldetektor använts, där det första massfiltret selekterar ut den intakta jonen, ”moderjonen”, och för in dessa till en kollisionkammare där jonerna fragmenteras. I ett andra massfilter selekteras sedan utvalda fragment, ”dotterjoner” ut och detekteras. Detta ger en mycket säker identifiering av analyterna på bas av en detektion av det specifika mönster av fragment de sönderfaller i.(7).

Vätskekromatografi

Vätskekromatografi är en separationsteknik där prov appliceras på stationär fas och uppdelning av provkomponenter sker genom eluering med en vätska. Principen för separation bygger på förhållandet mellan olika ämnens polaritet. Elueringshastigheten är beroende av elueringsmedlets polaritet i förhållande till provet och till den stationära fasen, även den stationära fasens polaritet i förhållande till provet påverkar hastigheten. Lika polaritet mellan stationärafasen och elueringsmedlet innebär en snabb eluering medan en mer olik polaritet ger en långsammare eluering. Uppdelningen av provets komponenter baseras på att de har olika affinitet till den stationära fasen och därför passerar genom denna fas med olika hastighet (7).

High performance liquid chromatography (HPLC) är en typ av vätskekromatografi där separation sker i en kolonn där prov samt elueringsmedel passerar under tryck. Vid HPLC används olika elueringsmedel som alla bör vara mycket rena för att ge ett tillfredställande resultat, vanligen används en blandning av vatten och metanol, acetonitril och/eller isopropanol (7).

Nackdel med analys av fosfatidyletanol

Ett problem med PEth-analysen är att bildningen av PEth kan fortsätta i röret efter provtagning om alkohol fanns i blodet vid provtagningstillfället (1). Idag finns inga tydliga regler etablerade om hur prov bäst förvaras för att minimera risken för fortsatt bildning och det finns därför anledning till att undersöka detta *in vitro*. Då resultaten av PEth-analys kan ha medicinska såväl som juridiska konsekvenser gällande arbete, körkort eller vårdnad av barn är det extra viktigt att resultatet inte förändras efter provtagning såsom kan ske då alkohol finns i blodet. Det är därför av intresse att undersöka detta för att kunna förvara prov på ett sätt som ger ett så korrekt svar som möjligt.

Syfte

I syfte att finna vetskap om hur bildningen av PEth påverkas vid olika former av förvaring genomföres en preanalytisk studie där promillehalt i bestämda nivåer tillsätts blod för att sedan förvaras under olika förhållanden (temperatur och tid). Resultatet hoppas bli vägledande i framtida hantering av prov för B-PEth-analys.

MATERIAL OCH METOD

För att svara på hur bildningen av B-PEth påverkades vid olika förvaring inducerades promillehalt i bestämda nivåer till blod från frivilliga och förvarades under skilda förhållanden; rumstempererat (21 °C), kyl (5 °C) samt frys (-23 °C). För att observera förändringen över tid frös aliquoter av prov in med bestämda intervall till en temperatur av -80 °C. Därefter upparbetades aliquoterna parallellt och analyserades med vätskekromatografi kopplad till trippel quadrupol mass-spektrometri teknik (LC-MS/MS). Metoden genomfördes i studie 1 samt 2 där metoden optimerades inför studie 2.

Etiska aspekter

Deltagare i studien informerades gällande studiens genomförande och syfte och gav ett informerat samtycke till sin delaktighet. Aidentifiering gjordes även där en siffra representerade var testperson. I studie 1 togs blod från två frivilliga testpersoner. I studie 2 togs blod från fem frivilliga testpersoner.

Provinsamling

Blod samlades in från frivilliga och friska testpersoner. Samtliga testpersoner hade en normal alkoholkonsumtion med alkoholintag i måttlig mängd (<50 g etanol per dag). Testpersonerna hade ej intagit alkohol under provtagningsdagen. Blod samlades i 6 ml-EDTA-rör (Vacuette, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österrike).

Inkubering av blod

Inkubationer av blod genomfördes med två olika promillehalter; 0,5 och 1,95 %. Etanol [95 %] tillsattes blodet droppvis under omrörning till önskade koncentrationer.

Blodsuspensionerna delades upp om 200 µl i eppendorfrör (1,5ml, Sarstedt, Nümbrecht, Tyskland) märkta med nummer kopplat till identitet, promillehalt, inkubationstid och förvaringstemperatur. Rören förvarades i respektive förvaringsmiljö under angivet tidsintervall. Efter förvaring vortexades prov och frös ned till -80 °C för att stoppa bildningen av PEth och för hemolys. Prov förvarades minst 1 timme i -80°C innan upparbetning.

Studie 1

I studie 1 analyserades prov efter 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 28, 32, 48, 52 samt 56 timmar. Prov förvarades i rumstemperatur (21 °C), kyl (5 °C) samt frys (-23 °C). För varje testperson frös 0-prov ned innan och efter tillsats av etanol.

Studie 2

I studie 2 förvarades prov i 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56, 72 samt 76 timmar. Prov förvarades i rumstemperatur (21 °C) och kyl (5 °C). För varje testperson frös 0-prov ned innan tillsats av etanol.

Analys av fosfatidyletanol

Prov tinades under vaggning i 40 min innan upparbetning i 1 ml 96-well sample collection plate (Waters, Milford, USA). Brunnar fylldes med 80 µl studieprov/0-blod/internkontroll/kalibrator. Till samtliga brunnar tillsattes 320 µl internstandard. Plattan täcktes med plastfilm och skakades i 20 min. Plattan centrifugerades med 4000 x g i 10 min. I plattans sista brunn tillsattes 800 µl blank (isopropanol).

Prov analyserades med trippel quadrupol mass-spektrometri (LC-MS/MS) teknik i maskinen Waters Acquity system med sample organiser, FTN-sample manager (I-kass) och binary solvent manager (I-klass) kopplad till Xevo TQ-S micro detektor (Waters, Milford, USA). Prov separerades på en Accucore C18-kolonn med dimensionen 100 x 2,1 mm och partikelstorlek 2,6 µm (Thermo Scientific, Waltham, USA). I maskinen användes reagenserna mobilfas A samt mobilfas B för att eluera det sökta provmaterialet från stationärfasen. För kvantifiering och konfirmering av analys användes programmet MassLynx (Waters, Milford, USA).

Lösningar och reagenser

0-blod bestod av poolade och fryslyserade patientprov med PEth <0,01 µM/L (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige). Internkontroller bestod av poolade och fryslyserade patientprov i koncentrationerna 0,04-0,065 µM/L (låg) samt 1,0-1,5 µM/L (hög) (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige). Kalibratorerna bestod av poolat och fryslyserat 0-blod (PEth <0,01 µM/L) (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige) som spikats med PEth-16:0/18:1 till koncentrationerna 0,04, 0,5 samt 3,0 µM/L med certifierat referensmaterial från Enzo Life Sciences (Solna, Sverige) som lösts upp i CHCl₃ och späts i isopropanol innan inspikning (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige). Internstandard bestod av 0,5 µM/L PEth-16:0/18:1-D3 (Enzo Life Sciences, Solna, Sverige) i isopropanol (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige).

Mobilfas A innehöll 4,8 mM/L ammoniumformat, acetronil [60 %], isopropanol [10 %] samt milliQ-vatten [30 %] (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige). Mobilfas B innehöll 4,8 mM/L ammoniumformat, acetronil [20 %], isopropanol [79 %] samt milliQ-vatten [1 %] (Universitetssjukhuset, Örebro, Sverige).

Statistisk bearbetning

Som gränsvärden för resultatbearbetning sattes en låg nivå (rapporteringsgränsen för låg alkoholkonsumtion) 0,05 μM samt en hög nivå (gräns för riskkonsumtion) 0,3 μM . Samtliga datavärden behandlades i kalkylprogrammet Excel version 14.5.1 (Microsoft, Redmond, USA). Parat t-test genomfördes för att jämföra bildningen i 5°C respektive 21°C vid samtliga tidpunkter samt för att jämföra halten PEth med startvärdet vid de olika tidpunkterna. Signifikansnivån för hypotesprövningen (H_0) sattes till $\alpha=0,05$. Data behandlades i IBM SPSS statistics version 22 (IBM Corporation, New York, USA).

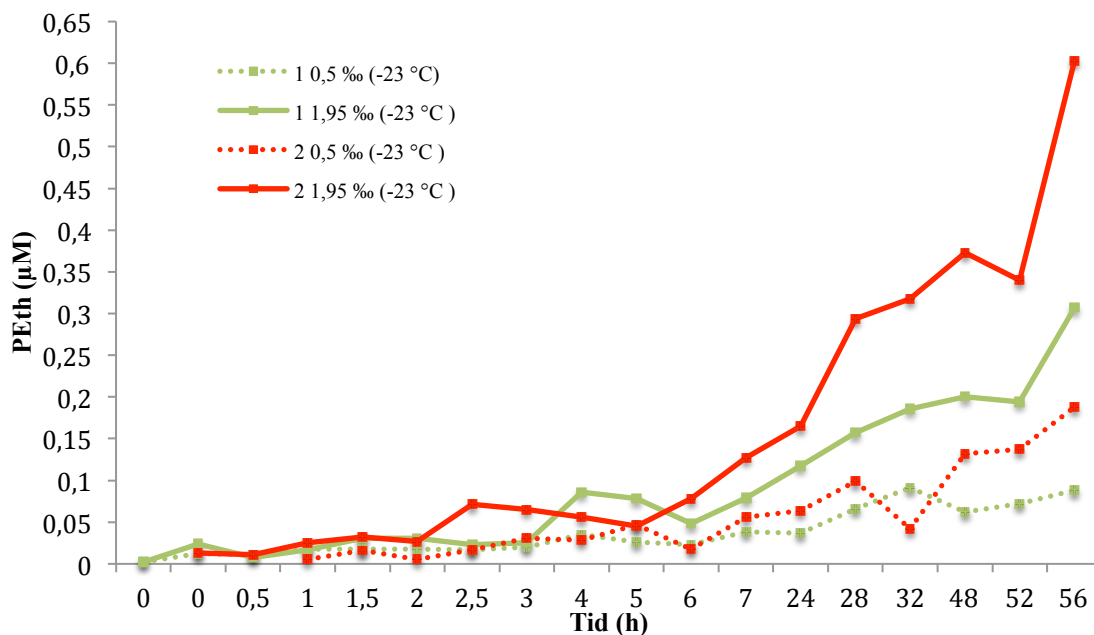
RESULTAT

Resultatet visade att bildningen av PEth fortskrider *in vitro* vid samtliga förvaringstemperaturer om alkohol fanns i blodet vid provtagningstillfället. Ingen signifikant skillnad förekom mellan förvaring i 5 respektive 21 °C.

Studie 1

Vid 0,5 % alkohol uppnåddes inte rapporteringsgränsen 0,05 µM PEth för försöksperson 1 eller 2 varken vid förvaring i 5 °C eller 21 °C i upp till 56 timmar (bilaga 1). Vid förvaring i -23 °C nådde försöksperson 1 gränsen (0,05 µM) efter 28 timmar och försöksperson 2 efter 7 timmar (figur 1). Högsta uppmätta halt PEth var efter förvaring i -23 °C, där försöksperson 1 hade 0,091 µM efter 32 timmar och försöksperson 2 hade 0,188 µM efter 56 timmar (figur 1).

Vid 1,95 % alkohol uppnåddes rapporteringsgränsen 0,05 µM PEth för båda försökspersonerna efter 4 timmar vid förvaring i 5 °C. Vid förvaring i 21 °C nådde försöksperson 1 gränsen efter 28 timmar och försöksperson 2 uppnådde ej gränsen under 56 timmar (bilaga 1). Vid förvaring i -23 °C nåddes gränsen för försöksperson 1 efter 4 timmar och försöksperson 2 efter 2,5 timmar, den övre gränsen 0,3 µM PEth uppnådde försöksperson 1 efter 56 timmar och försöksperson 2 efter 32 timmar (figur 1). Högsta uppmätta halt PEth var efter förvaring i -23 °C under 56 timmar 0,307 µM för försöksperson 1 och 0,603 µM för försöksperson 2 (figur 1).



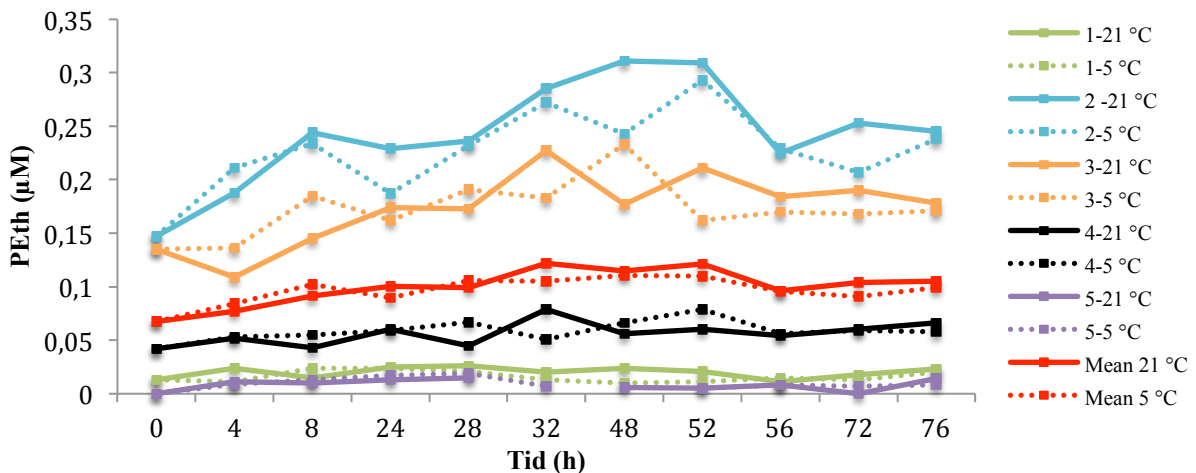
Figur 1. Figuren visar bildningen av fosfatidyletanol (PEth) över tid vid förvaring i -23 °C för två testpersoner (1 respektive 2) med de två olika promillehalterna 0,5 och 1,95 % tillsatt i blodet.

Studie 2

Vid 0,5 % alkohol uppnåddes inte rapporteringsgränsen 0,05 μM PEth för försöksperson 1 och 5 varken vid förvaring i 5 eller 21 °C i upp till 76 timmar (figur 2, bilaga 2).

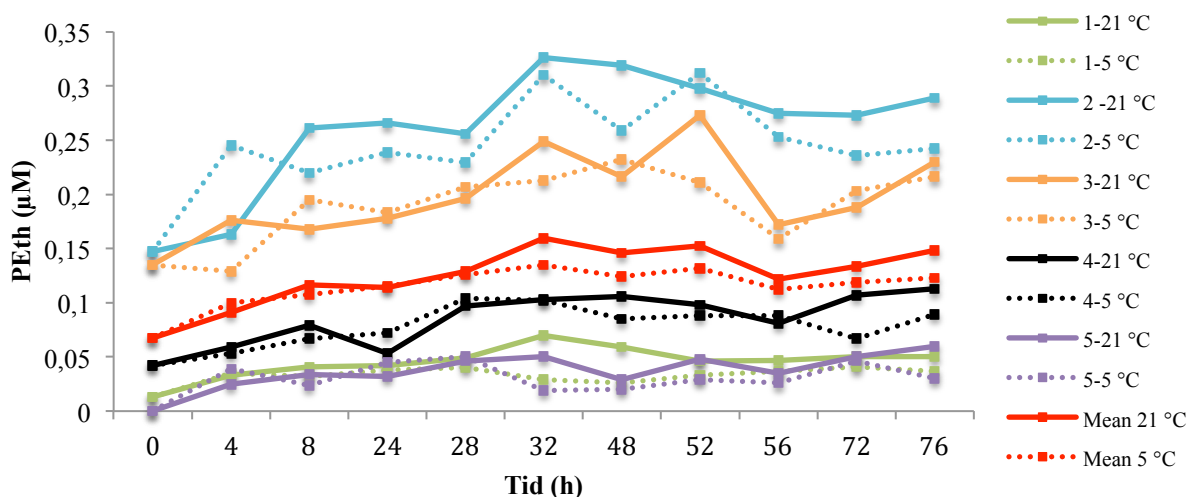
Försöksperson 4 nådde gränsen efter 4 timmar både vid förvaring i 5 och 21 °C.

Försöksperson 2 och 3 hade värden över rapporteringsgränsen redan i sitt 0-prov, halten PEth i 0-proven var 0,147 μM för försöksperson 2 och 0,135 μM för person 3. Försöksperson 2 nådde den övre gränsen 0,3 μM efter 48 timmar i 21 °C. Högsta uppmätta halt PEth var efter förvaring i 21 °C för försöksperson 1, 2 samt 3, försöksperson 1 nådde maximalt 0,026 μM efter 28 timmar, person 2 nådde 0,311 μM efter 48 timmar och person 3 nådde 0,227 μM efter 32 timmar. Försöksperson 4 uppnådde samma maximala värde (0,079 μM PEth) i både 5 och 21 °C, i 5 °C erhöles värdet efter 52 timmar och i 21 °C efter 32 timmar. Försöksperson 5 erhöles högsta halt PEth 0,019 μM i 5 °C efter 28 timmar (figur 2)



Figur 2. Figuren visar bildningen av fosfatidyletanol (PEth) över tid vid förvaring i 5 och 21 °C för fem testpersoner med 0,5 % alkohol tillsatt i blodet. Figuren visar även medelvärde för samtliga tidpunkter vid förvaring i 5 och 21 °C.

Vid 1,95 % uppnåddes inte rapporteringsgränsen 0,05 μM PEth för försöksperson 1 vid förvaring i 5 °C i upp till 76 timmar, vid förvaring i 21 °C nådde person 1 gränsen efter 32 timmar (figur 3, bilaga 2). Försöksperson 4 och 5 nådde gränsen vid förvaring i både 5 och 21 °C, person 4 nådde gränsen efter 4 timmar i båda förvaringar, person 5 nådde gränsen efter 28 timmar i 5 °C och efter 32 timmar i 21 °C. Försöksperson 2 och 3 hade värden över rapporteringsgränsen redan i sitt 0-prov, försöksperson 2 nådde den övre gränsen 0,3 μM efter 32 timmar i både 5 och 21 °C. Högsta uppmätta halt PEth var efter förvaring i 21 °C för samtliga försökspersoner. Försöksperson 1 nådde maximalt 0,07 μM efter 32 timmar, person 2 nådde 0,326 μM efter 32 timmar, person 3 nådde 0,273 μM efter 52 timmar, person 4 nådde 0,113 μM efter 76 timmar och person 5 nådde 0,06 μM efter 76 timmar (figur 3).



Figur 3. Figuren visar bildningen av fosfatidyletanol (PEth) över tid vid förvaring i 5 och 21 °C för fem testpersoner med 1,95 ‰ alkohol tillsatt i blodet. Figuren visar även medelvärde för samtliga tidpunkter vid förvaring i 5 och 21 °C.

Statistisk analys studie 2

Vid 0,5 ‰ förekom en signifikant skillnad ($p < 0,05$) mellan 5 och 21 °C efter förvaring i 76 timmar, i övrigt förekom ingen signifikant skillnad (bilaga 3). Vid jämförelse av halten PEth i 0-prov med halten vid de olika tidsintervallen för de två temperaturerna sågs en signifikant skillnad ($p < 0,05$) efter 24 timmar i 5 °C, i övrigt förekom ingen signifikant skillnad (bilaga 3).

Vid 1,95 ‰ förekom en signifikant skillnad ($p < 0,05$) mellan 5 och 21 °C efter förvaring i 32 och 76 timmar, i övrigt förekom ingen signifikant skillnad (bilaga 3). Vid jämförelse av halten PEth i 0-prov med halten efter förvaring i de olika tidsintervallen förekom en signifikant skillnad ($p < 0,05$) vid samtliga tider utom 24 timmar i 21 °C. Vid förvaring i 5 °C var halten PEth signifikant ($p < 0,05$) högre vid samtliga tidpunkter förutom efter 4, 32 och 52 timmar (bilaga 3).

Från 32 timmars inkubering och framåt sågs ett mönster med ett högre medelvärde PEth för prov förvarade i 21 °C än för prov förvarade i 5 °C (bilaga 3).

DISKUSSION

Syftet, att finna vetskap om hur bildningen av PEth påverkas vid olika förvaringsförhållanden uppnåddes. Bildningen av PEth kan fortskrida *in vitro* om alkohol närvarade i blodet vid provtagningstillfället. För samtliga prov som förvarats i kyl respektive rumstempererat sågs ingen betydande skillnad i bildningen av PEth och resultatet utföll därmed inte som förväntat eftersom ingen signifikant skillnad förelåg mellan de olika förvaringsförhållandena.

Resultatet av studien bekräftade det som tidigare studier visat, nämligen att PEth kan bildas *in vitro* om alkohol närvarar i blodet (8). Fosfatidylkolin och etanol som är beroende av varandra för bildningen av fosfatidyletanol är anledningen till att PEth kan bildas *in vitro*, det tyder också på att reaktionen kommer att fortgå ända tills något av reagensen (etanol eller fosfatidylkolin) tar slut.

Resultatet visar att ingen signifikant skillnad av betydelse förelåg mellan förvaring i 5 respektive 21 °C. Den enda signifikanta skillnaden som uppmättes var för 1,95 ‰ vid tidpunkten 32 och 76 timmar och för 0,5 ‰ vid 76 timmar. Att denna skillnad endast uppkom vid en respektive två inkubationstider som dessutom låg långt ifrån varandra i intervallen tyder på att skillnaden kan ha uppstått på grund av slumpen. Med anledning av att över 200 prov analyserades är risken hög att slumpen påverkat något eller några av resultaten. För att ta hänsyn till de variationer som kan uppstå när många data behandlas i en studie kunde ett Bonferroni-test ha genomförts för att minska chansen av falskt positiva resultat. I denna studie genomfördes endast ett vanligt T-test eftersom resultatet inte ansågs ha så pass stor betydelse att ett Bonferroni-test var befogat.

Vid frysförvaring uppkom däremot en förväntad ökad bildning av PEth som påvisats i tidigare studier (6, 8). Att det ses en kraftig bildning av PEth vid frysförvaring kan bero på att vatten i blodet fryser medan etanolen, fosfatidylkolin och enzymet fosfolipas D fortfarande är aktiva. Etanol och fosfatidylkolin får då en optimal temperatur att samverka i och denna teori stärks utav att bildningen i princip helt avstannar vid -80 °C, då alla komponenter delaktiga i reaktionen troligen är frysta.

I tidigare studier av fortsatt bildning av PEth efter provtagning har erythrocyter separerats från övriga blodceller genom centrifugering. De separerade erythrocyterna har sedan blandats med trombocytbefriad plasma av AB-blodgrupp. Etanol har tillsatts i lämplig promillehalt med därpå följande inkubation på skakbord vid utvalda tider. Efter inkubering genomgår hemolys genom tillsats av avjoniserat vatten följt av centrifugering som lämnar en erythrocytpellet redo för lipidextraktion (9). Vid planering av den aktuella studien användes detta exempel som inspirationskälla då de även i den studien tillsatte alkohol i blodet för att se en inducerad bildning a PEth. I den aktuella/nuvarande studien gjordes valet att ej ersätta försökspersonernas plasma för att försöka efterlikna förloppet vid provtagning inom vården så mycket som möjligt, av denna anledning så skakades ej heller proven under inkubationstiden. I den nuvarande studien skedde hemolys genom fryslysning i -80 °C, då det är den metod som används på laboratoriet för klinisk kemi vid Örebro universitetssjukhus. Syftet i de två olika studierna var något olika där de i den äldre studien ville påvisa att PEth-bildning kunde ske *in vitro* och i denna studie var målet att visa den praktiska betydelsen för provtagning och analys vid fortsatt bildning av PEth. Denna studie kan ses som en vidareutveckling av den tidigare studien eftersom de gav kunskap om att PEth kan bildas *in vitro*. Metoderna för de två studierna är helt enkelt bäst anpassat efter sitt egna syfte.

Resultaten i studie 1 användes som riktlinje för att optimera metoden för studie 2. I studie 2 användes därför färre inkubationstider fast över en längre tid. Trots att optimering gjordes inför studie 2 sågs fortfarande pendlande värden i resultatet där det vid flera tillfällen uppstod lägre värden efter längre inkubering. Eventuellt kunde ännu färre intervall ha nyttjats för en stabilare följd av värden med en mer linjär ökning av PEth, dock hade det gett slumpvariationer en ännu större betydelse för resultatet.

De promillehalter som tillsattes blodet avspeglade en låg respektive högre konsumtion av alkohol, alternativt kvarvarande alkohol efter berusning dagen innan. Även om det torde anses olämpligt att komma berusad till provtagning för PEth-analys så förekommer det och det är sannolikt att de personer som lämnar prov onyktra har en tendens att tåla högre promillehalter. Således kunde eventuellt en ännu högre promillehalt ha spikats i ytterligare ett prov för att se hur bildningen skulle se ut i en sådan situation. Trots det fångades ett bra område upp där nivån PEth ökade över tid även för den lägre promillehalten.

I resultatet syntes en pendling i bildningen av PEth, där det vid flera tillfällen uppstod lägre värden efter längre inkubering som kan förklaras med påverkan av flera olika faktorer.

Analysmetoden är mycket känslig och därför är det i princip omöjligt att få exakt samma värden även om samma prov testas flera gånger vid samma analystillfälle. Med anledning av att så många prov analyserades i denna studie så kunde inte samtliga prov analyseras vid samma tillfälle vilket också medförde att kalibreringarna utföll något annorlunda vid varje analystillfälle som därmed ger en variation i resultaten. Variationen kan även vara beroende av etanolfördelningen i blodet då det pytsades upp i eppendorfrör för inkubering.

Blodsuspensionen kan ha varit icke homogen till följd av för kort blandning eller som följd av sedimentering under tiden proven pytsades upp i rör. Ett alternativ hade varit att ha kvar allt blod i originalröret och sedan ta av aliquoter allt eftersom, detta hade kanske gett jämnare resultat. Dock hade det varit praktiskt svårare, speciellt i studie 2, då flertalet rör skulle frysas in för analys samtidigt.

Resultatet visade att ingen större signifikant skillnad förelåg mellan förvaring i rumstemperatur respektive kyl men att det ändå sågs ett något högre medelvärde för de rumsförvarade proven. I studie 1 påvisades en ökad bildning av PEth vid förvaring i vanlig frys (-23 °C) vilket bekräftar tidigare studier. Slutsatsen blir därför att aktuell rekommendation om att utesluta frysförvaring (-23 °C) bör kvarstå, samt att rekommendationen om kylförvaring direkt efter provtagning kan anses befogad och behållas trots dess ej signifikanta påverkan på resultat.

REFERENSER

1. Isaksson A, Walther L, Alling C, Hansson, T. Fosfatidyletanol i blod (B-PEth) – ny markör för alkoholmissbruk. *Läkartidningen*. 2009;106:1094-8.
2. Helander A, Hansson T. Nationell harmonisering av alkoholmarkören PEth. *Läkartidningen*. 2013;110:39-40.
3. PEth, B- [Internet]. Örebro: Laboratoriemedicinska kliniken universitetssjukhuset Örebro;-[citerad 2017 Jan 18]. Tillgänglig från: <https://provtagningssanvisningar.regionorebrolan.se/>
4. Helander A, Hansson T. Biomarkörer kan fånga tidigt riskbruk av alkohol. *Läkartidningen*. 2011;45:2291-5.
5. Zheng Y, Beck O, Helander A. Method development for routine liquid chromatography–mass spectrometry measurement of the alcohol biomarker phosphatidylethanol (PEth) in blood [dissertation]. Stockholm: Karolinska institutet; 2011.
6. Helander A, Zheng Y. Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS [dissertation]. Stockholm: Karolinska institutet; 2009.
7. Simonsen F. *Analysteknik: instrument och metoder*. Lund: Studentlitteratur; 2005.
8. Seidel L, Wurst F M, Jönsson B A.G, Alling C. Phosphatidylethanol in Human Organs and Blood: A Study on Autopsy Material and Influences by Storage Conditions [dissertation]. Lund: Lunds universitet; 2006.
9. Varga A, Alling C. Formation of phosphatidylethanol in vitro in red blood cells from healthy volunteers and chronic alcoholics [dissertation]. Lund: Lunds universitet; 2002.

ID	µM	ID	µM	ID	µM	ID	µM	ID	µM	
Reag Blank		2-60-F 0.5	0.005	1-180-F 0.5	0.020	2-6-K 0.5	0.007	1-216-K 0.5	0.016	
0-Blod		1-60-F 1.95	0.017	2-180-F 0.5	0.031	1-6-K 1.95	0.043	2-216-K 0.5	0.004	
0.04	0.049	2-60-F 1.95	0.025	1-180-F 1.95	0.025	2-6-K 1.95	0.036	1-216-K 1.95	0.034	
0.04	0.049	1-90-R 0.5	0.011	2-180-F 1.95	0.065	1-6-F 0.5	0.023	2-216-K 1.95	0.026	
0.5	0.453	2-90-R 0.5		998895	0.066	2-6-F 0.5	0.018	1-216-F 0.5	0.091	
0.5	0.442	1-90-R 1.95	0.017	998896	1.232	1-6-F 1.95	0.048	2-216-F 0.5	0.042	
3.0	3.036	2-90-R 1.95	0.014	Reag Blank	0.041	2-6-F 1.95	0.078	1-216-F 1.95	0.186	
3.0	3.051	1-90-K 0.5	0.008	Reag Blank		1-7-R 0.5	0.020	2-216-F 1.95	0.318	
0-Blod		2-90-K 0.5		0-Blod		2-7-R 0.5	0.007	1-308-R 0.5	0.026	
	998895	0.036	1-90-K 1.95	0.023	0.04	0.036	1-7-R 1.95	0.045	2-308-R 0.5	0.003
	998896	0.984	2-90-K 1.95	0.005	0.04	0.036	2-7-R 1.95	0.036	1-308-R 1.95	0.049
1-O	0.002	1-90-F 0.5	0.018	0.5	0.521	1-7-K 0.5	0.018	998895	0.082	
2-0		2-90-F 0.5	0.016	0.5	0.507	2-7-K 0.5	0.007	998896	1.529	
1-0-0.5	0.012	1-90-F 1.95	0.031	3.0	3.651	1-7-K 1.95	0.038	Reag Blank		
2-0-0.5	0.000	2-90-F 1.95	0.032	3.0	3.666	2-7-K 1.95	0.032	1-316-F 1.95	0.307	
1-0-1.95	0.024	1-120-R 0.5	0.013	0-Blod		1-7-F 0.5	0.038	2-316-F 1.95	0.603	
2-0-1.95	0.013	2-120-R 0.5		998895	0.066	2-7-F 0.5	0.056	2-308-R 1.95	0.034	
1-30-R 0.5	0.004	1-120-R 1.95	0.018	998896	1.354	1-7-F 1.95	0.079	1-308-K 0.5	0.018	
2-30-R 0.5		2-120-R 1.95	0.010	1-4-R 0.5	0.031	2-7-F 1.95	0.127	2-308-K 0.5		
1-30-R 1.95	0.013	1-120-K 0.5	0.007	2-4-R 0.5	0.015	1-208-R 0.5	0.024	1-308-K 1.95	0.048	
2-30-R 1.95	0.007	2-120-K 0.5		1-4-R 1.95	0.039	2-208-R 0.5	0.006	2-308-K 1.95	0.017	
1-30-K 0.5	0.014	1-120-K 1.95	0.021	2-4-R 1.95	0.047	1-208-R 1.95	0.046	1-308-F 0.5	0.062	
2-30-K 0.5		2-120-K 1.95	0.006	1-4-K 0.5	0.021	2-208-R 1.95	0.037	2-308-F 0.5	0.132	
1-30-K 1.95	0.021	1-120-F 0.5	0.018	2-4-K 0.5	0.010	1-208-K 0.5	0.017	1-308-F 1.95	0.200	
2-30-K 1.95	0.012	2-120-F 0.5	0.005	1-4-K 1.95	0.050	2-208-K 0.5	0.004	2-308-F 1.95	0.373	
1-30-F 0.5	0.011	1-120-F 1.95	0.031	2-4-K 1.95	0.055	1-208-K 1.95	0.040	1-312-R 0.5	0.024	
2-30-F 0.5	0.003	2-120-F 1.95	0.027	1-4-F 0.5	0.035	2-208-K 1.95	0.032	2-312-R 0.5	0.005	
1-30-F 1.95	0.008	1-150-R 0.5	0.010	2-4-F 0.5	0.028	1-208-F 0.5	0.037	1-312-R 1.95	0.054	
2-30-F 1.95	0.011	2-150-R 0.5		1-4-F 1.95	0.086	2-208-F 0.5	0.064	2-312-R 1.95	0.041	
1-60-R 0.5	0.014	1-150-R 1.95	0.016	2-4-F 1.95	0.056	1-208-F 1.95	0.117	1-312-K 0.5	0.018	
2-60-R 0.5		2-150-R 1.95	0.006	1-5-R 0.5	0.023	2-208-F 1.95	0.165	2-312-K 0.5	0.005	
1-60-R 1.95	0.020	1-150-K 0.5	0.013	2-5-R 0.5	0.006	1-212-R 0.5	0.018	1-312-K 1.95	0.044	
2-60-R 1.95	0.007	2-150-K 0.5		1-5-R 1.95	0.041	2-212-R 0.5	0.008	2-312-K 1.95	0.030	
1-60-K 0.5	0.006	1-150-K 1.95	0.019	2-5-R 1.95	0.040	1-212-R 1.95	0.053	1-312-F 0.5	0.072	
2-60-K 0.5		2-150-K 1.95	0.010	1-5-K 0.5	0.007	2-212-R 1.95	0.035	2-312-F 0.5	0.137	
1-60-K 1.95	0.025	1-150-F 0.5	0.017	2-5-K 0.5	0.001	1-212-K 0.5	0.021	1-312-F 1.95	0.194	
2-60-K 1.95		2-150-F 0.5	0.017	1-5-K 1.95	0.039	2-212-K 0.5	0.010	2-312-F 1.95	0.340	
1-60-F 0.5	0.018	1-150-F 1.95	0.023	2-5-K 1.95	0.042	1-212-K 1.95	0.064	1-316-R 0.5	0.027	
		2-150-F 1.95	0.071	1-5-F 0.5	0.026	2-212-K 1.95	0.058	2-316-R 0.5	0.007	
		1-180-R 0.5	0.012	2-5-F 0.5	0.047	1-212-F 0.5	0.066	1-316-R 1.95	0.069	
		2-180-R 0.5		1-5-F 1.95	0.078	2-212-F 0.5	0.099	2-316-R 1.95	0.044	
		1-180-R 1.95	0.027	2-5-F 1.95	0.045	1-212-F 1.95	0.157	1-316-K 0.5	0.019	
		2-180-R 1.95	0.012	1-6-R 0.5	0.009	2-212-F 1.95	0.294	2-316-K 0.5	0.005	
		1-180-K 0.5	0.013	2-6-R 0.5	0.008	1-216-R 0.5	0.024	1-316-K 1.95	0.043	
		2-180-K 0.5	0.003	1-6-R 1.95	0.041	2-216-R 0.5		2-316-K 1.95	0.026	
		1-180-K 1.95	0.028	2-6-R 1.95	0.023	1-216-R 1.95	0.049	1-316-F 0.5	0.088	
		2-180-K 1.95	0.011	1-6-K 0.5	0.021	2-216-R 1.95	0.035	2-316-F 0.5	0.188	

ID tolkas enligt: 1 och 2 representerar försökspersoner följt av antal minuter eller timmar dag 1. 2 och 3 representerar dag 2 och 3 med följt att klockslag för avslutad inkubation 08, 12 eller 16. R, K och F (rum, kyl och frys), 0,5 samt 1,95 står för promillehalt.

ID	µM	ID	µM	ID	µM	ID	µM
Reag Blank		4-48-R 0.5	0.056	0-Blod		3-72-R 1.95	0.188
Reag Blank		4-48-R 1.95	0.106	Reag Blank		4-72-R 0.5	0.060
0-Blod		5-48-R 0.5	0.006	Reag Blank		4-72-R 1.95	0.107
0.04	0.040	5-48-R 1.95	0.029	0-Blod		5-72-R 0.5	0.000
0.04	0.043	1-48-K 0.5	0.010	0.04	0.057	5-72-R 1.95	0.050
0.5	0.575	1-48-K 1.95	0.026	0.04	0.055	1-72-K 0.5	0.013
0.5	0.580	2-48-K 0.5	0.243	0.5	0.371	1-72-K 1.95	0.041
3.0	2.904	2-48-K 1.95	0.259	0.5	0.373	2-72-K 0.5	0.207
3.0	2.936	3-48-K 0.5	0.233	3.0	3.139	2-72-K 1.95	0.236
0-Blod		3-48-K 1.95	0.232	3.0	3.085	3-72-K 0.5	0.168
998895	0.054	4-48-K 0.5	0.066	0-Blod		3-72-K 1.95	0.203
998896	1.402	4-48-K 1.95	0.085	998895	0.071	4-72-K 0.5	0.059
1-32-R 0.5	0.020	5-48-K 0.5		998896	1.395	4-72-K 1.95	0.067
1-32-R 1.95	0.070	5-48-K 1.95	0.020	1-56-R 0.5	0.011	5-72-K 0.5	0.007
2-32-R 0.5	0.285	1-52-R 0.5	0.021	1-56-R 1.95	0.047	5-72-K 1.95	0.046
2-32-R 1.95	0.326	1-52-R 1.95	0.046	2-56-R 0.5	0.225	1-76-R 0.5	0.023
3-32-R 0.5	0.227	2-52-R 0.5	0.309	2-56-R 1.95	0.275	1-76-R 1.95	0.050
3-32-R 1.95	0.249	2-52-R 1.95	0.298	3-56-R 0.5	0.184	2-76-R 0.5	0.245
4-32-R 0.5	0.079	3-52-R 0.5	0.211	3-56-R 1.95	0.172	2-76-R 1.95	0.289
4-32-R 1.95	0.103	3-52-R 1.95	0.273	4-56-R 0.5	0.054	3-76-R 0.5	0.178
5-32-R 0.5		4-52-R 0.5	0.060	4-56-R 1.95	0.081	3-76-R 1.95	0.230
5-32-R 1.95	0.050	4-52-R 1.95	0.098	5-56-R 0.5	0.008	4-76-R 0.5	0.066
1-32-K 0.5	0.013	5-52-R 0.5	0.005	5-56-R 1.95	0.035	4-76-R 1.95	0.113
1-32-K 1.95	0.029	5-52-R 1.95	0.048	1-56-K 0.5	0.015	5-76-R 0.5	0.014
2-32-K 0.5	0.272	1-52-K 0.5	0.011	1-56-K 1.95	0.037	5-76-R 1.95	0.060
2-32-K 1.95	0.310	1-52-K 1.95	0.033	2-56-K 0.5	0.229	1-76-K 0.5	0.020
3-32-K 0.5	0.183	2-52-K 0.5	0.293	2-56-K 1.95	0.253	1-76-K 1.95	0.037
3-32-K 1.95	0.213	2-52-K 1.95	0.312	3-56-K 0.5	0.170	2-76-K 0.5	0.238
4-32-K 0.5	0.051	3-52-K 0.5	0.162	3-56-K 1.95	0.159	2-76-K 1.95	0.242
4-32-K 1.95	0.102	3-52-K 1.95	0.211	4-56-K 0.5	0.056	3-76-K 0.5	0.171
5-32-K 0.5	0.007	4-52-K 0.5	0.079	4-56-K 1.95	0.088	3-76-K 1.95	0.216
5-32-K 1.95	0.019	4-52-K 1.95	0.088	5-56-K 0.5	0.008	4-76-K 0.5	0.058
1-48-R 0.5	0.024	5-52-K 0.5	0.005	5-56-K 1.95	0.026	4-76-K 1.95	0.089
1-48-R 1.95	0.059	5-52-K 1.95	0.029	1-72-R 0.5	0.018	5-76-K 0.5	0.008
2-48-R 0.5	0.311	998895	0.104	1-72-R 1.95	0.050	5-76-K 1.95	0.030
2-48-R 1.95	0.319	998896	1.925	2-72-R 0.5	0.253	998895	0.074
3-48-R 0.5	0.177	0-Blod		2-72-R 1.95	0.273	998896	1.243
3-48-R 1.95	0.216	0-Blod		3-72-R 0.5	0.190	0-Blod	
						0-Blod	
						0-Blod	

ID tolkas enligt: 1-5 representerar försökspersoner följt av antal timmar som följs av R eller K (rum och kyl), 0,5 och 1,95 står för promillehalt.

Förändring efter 4 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	,0072000	,0171231	,0076577	-,0284611	,0140611	-,940	4	,400
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	-,009000	,046808	,020933	-,067120	,049120	-,430	4	,689

Förändring efter 8 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	-,0108000	,0183766	,0082183	-,0336176	,0120176	1,314	4	,259
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	,009000	,024135	,010794	-,020968	,038968	,834	4	,451

Förändring efter 24 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	,0104000	,0186091	,0083223	-,0127063	,0335063	1,250	4	,280
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	-,001200	,017978	,008040	-,023522	,021122	-,149	4	,889

Förändring efter 28 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	,0070000	,0124499	,0055678	-,0224586	,0084586	-1,257	4	,277
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	,002800	,015466	,006917	-,016404	,022004	,405	4	,706

Förändring efter 32 h

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5‰ - kyl 0,5‰	,0230000	,0165529	,0082765	,0033394	,0493394	2,779	3	,069
Pair 2	rum 1,95‰ - kyl 1,95‰	,0250000	,016355	,007314	,004692	,045308	3,418	4	,027

Förändring efter 48 h

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5‰ - kyl 0,5‰	,0040000	,0516140	,0258070	-,0781293	,0861293	,155	3	,887
Pair 2	rum 1,95‰ - kyl 1,95‰	,021400	,028183	,012604	-,013594	,056394	1,698	4	,165

Förändring efter 52 h

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5‰ - kyl 0,5‰	,0112000	,0249540	,0111597	-,0197844	,0421844	1,004	4	,372
Pair 2	rum 1,95‰ - kyl 1,95‰	,018000	,027613	,012349	-,016287	,052287	1,458	4	,219

Förändring efter 56 h

		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5‰ - kyl 0,5‰	,0008000	,0075631	,0033823	-,0085908	,0101908	,237	4	,825
Pair 2	rum 1,95‰ - kyl 1,95‰	,009400	,010502	,004697	-,003640	,022440	2,001	4	,116

Förändring efter 72 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	,0134000	,0210784	,0094266	-,0127723	,0395723	1,422	4	,228
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	,015000	,023270	,010407	-,013894	,043894	1,441	4	,223

Förändring efter 76 h

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	rum 0,5% - kyl 0,5%	,0062000	,0019235	,0008602	,0038116	,0085884	7,207	4	,002
Pair 2	rum 1,95% - kyl 1,95%	,025600	,013903	,006218	,008337	,042863	4,117	4	,015

Rumstemperatur 0,5 % 0-prov mot tid

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	0 - 4	-,0094000	,0237550	,0106236	-,0388957	,0200957	-,885	4	,426
Pair 2	0 - 8	-,024000	,041030	,018349	-,074946	,026946	-1,308	4	,261
Pair 3	0 - 24	-,032800	,029592	,013234	-,069544	,003944	-2,478	4	,068
Pair 4	0 - 28	-,031600	,034551	,015452	-,074501	,011301	-2,045	4	,110
Pair 5	0 - 32	-,0685000	,0581865	,0290932	-,1610877	,0240877	-2,354	3	,100
Pair 6	0 - 48	-,0474000	,0666693	,0298154	-,1301809	,0353809	-1,590	4	,187
Pair 7	0 - 52	-,0538000	,0670090	,0299673	-,1370026	,0294026	-1,795	4	,147
Pair 8	0 - 56	-,0290000	,0335112	,0149867	-,0706096	,0126096	-1,935	4	,125
Pair 9	0 - 72	-,0368000	,0442685	,0197975	-,0917666	,0181666	-1,859	4	,137
Pair 10	0 - 76	-,0378000	,0359889	,0160947	-,0824861	,0068861	-2,349	4	,079

Kyl 0,5 % 0-prov mot tid

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	0 - 4	-,0166000	,0270426	,0120938	-,0501778	,0169778	-1,373	4	,242
Pair 2	0 - 8	-,034800	,033439	,014955	-,076321	,006721	-2,327	4	,081
Pair 3	0 - 24	-,022400	,011393	,005095	-,036546	-,008254	-4,396	4	,012
Pair 4	0 - 28	-,038600	,031469	,014073	-,077674	,000474	-2,743	4	,052
Pair 5	0 - 32	-,0378000	,0522370	,0233611	-,1026608	,0270608	-1,618	4	,181
Pair 6	0 - 48	-,0537500	,0511493	,0255746	-,1351399	,0276399	-2,102	3	,126
Pair 7	0 - 52	-,0426000	,0599358	,0268041	-,1170201	,0318201	-1,589	4	,187
Pair 8	0 - 56	-,0282000	,0325454	,0145547	-,0686104	,0122104	-1,938	4	,125
Pair 9	0 - 72	-,0234000	,0239228	,0106986	-,0531041	,0063041	-2,187	4	,094
Pair 10	0 - 76	-,0316000	,0351895	,0157372	-,0752935	,0120935	-2,008	4	,115

Rumstemperatur 1,95 % 0-prov mot tid.

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	0 - 4	-,0238000	,0102323	,0045760	-,0365051	-,0110949	-5,201	4	,007
Pair 2	0 - 8	-,049200	,036369	,016265	-,094358	-,004042	-3,025	4	,039
Pair 3	0 - 24	-,046800	,041967	,018768	-,098908	,005308	-2,494	4	,067
Pair 4	0 - 28	-,061400	,028237	,012628	-,096460	-,026340	-4,862	4	,008
Pair 5	0 - 32	-,0922000	,0547786	,0244978	-,1602167	-,0241833	-3,764	4	,020
Pair 6	0 - 48	-,0784000	,0558238	,0249652	-,1477144	-,0090856	-3,140	4	,035
Pair 7	0 - 52	-,0852000	,0549518	,0245752	-,1534317	-,0169683	-3,467	4	,026
Pair 8	0 - 56	-,0546000	,0410768	,0183701	-,1056035	-,0035965	-2,972	4	,041
Pair 9	0 - 72	-,0662000	,0348812	,0155994	-,1095108	-,0228892	-4,244	4	,013
Pair 10	0 - 76	-,0810000	,0399812	,0178802	-,1306433	-,0313567	-4,530	4	,011

Kyl 1,95 % 0-prov mot tid.

		Paired Differences							
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference		t	df	Sig. (2-tailed)
					Lower	Upper			
Pair 1	0 - 4	-,0328000	,0399587	,0178701	-,0824153	,0168153	-1,835	4	,140
Pair 2	0 - 8	-,0402000	,024550	,010979	-,070683	-,009717	-3,662	4	,022
Pair 3	0 - 24	-,0480000	,026448	,011828	-,080840	-,015160	-4,058	4	,015
Pair 4	0 - 28	-,0586000	,021279	,009516	-,085021	-,032179	-6,158	4	,004
Pair 5	0 - 32	-,0672000	,0597721	,0267309	-,1414168	,0070168	-2,514	4	,066
Pair 6	0 - 48	-,0570000	,0450722	,0201569	-,1129645	-,0010355	-2,828	4	,047
Pair 7	0 - 52	-,0672000	,0586916	,0262477	-,1400752	,0056752	-2,560	4	,063
Pair 8	0 - 56	-,0452000	,0352307	,0157556	-,0889447	-,0014553	-2,869	4	,046
Pair 9	0 - 72	-,0512000	,0272158	,0121713	-,0849929	-,0174071	-4,207	4	,014
Pair 10	0 - 76	-,0554000	,0313257	,0140093	-,0942960	-,0165040	-3,955	4	,017