

# **Rask påvisning av basiske legemidler i urin ved væskefase-mikroekstraksjon kombinert med desorpsjon-elektrosprayionisering og massespektrometri.**

**Linda Flø**



Faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk kjemi,

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2010

---

# **Rask påvisning av basiske legemidler i urin ved væskefase-mikroekstraksjon kombinert med desorpsjon-elektrosprayionisering og massespektrometri.**

LINDA FLØ

Masteroppgave ved Faggruppen for legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Det praktiske laboratoriearbeidet ble utført ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet fra august 2009 til februar 2010.

Veiledere

Professor Stig Pedersen-Bjergaard, Universitetet i Oslo

Ph.d.student Janina Thunig, Københavns Universitet

Professor, dr.pharm. Steen Honoré Hansen, Københavns Universitet

Adjunkt Christian Janfelt, Københavns Universitet

## FORORD

Først vil jeg takke min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for svært god veiledning og oppfølging under arbeidet med denne oppgaven. Jeg setter stor pris på at du har tatt deg så god tid til å hjelpe meg når det har vært problemer og spørsmål, og for at du har hatt en så positiv og motiverende innstilling hele veien.

Jeg vil også rette en meget stor takk til min hovedveileder i København, Janina Thunig. Du har gitt meg så mye uvurderlig hjelp underveis. Tusen takk for at du hele tiden har tatt deg tid til å hjelpe meg, både på Farma og på mail etter Københavnoppholdet.

Takk til Steen Honoré Hansen for at du tok så godt imot oss norske utvekslingsstudenter, og for hjelp og gode råd i forbindelse med oppgaven. Takk til Christian Janfelt for god opplæring på MS-apparatet og for ellers god hjelp.

Jeg vil også takke medstudentene mine for en fin studietid, og takk til masterstudentene på analyseavdelingen for gode tips i forbindelse med skriving av oppgaven!

Takk til familien min for støtte og engasjement gjennom hele studietiden.

Sist, men ikke minst; tusen takk til Sunniva for et supert opphold i København! Jeg setter virkelig pris på den tiden vi hadde sammen i Danmark. Takk for all støtte og at du vet å trylle fram et smil hos meg, selv på litt vel vanskelige lab-dager.

Oslo, Mai 2010

Linda Flø

# INNHold

<b>FORORD</b> .....	<b>3</b>
<b>INNHold</b> .....	<b>4</b>
<b>1. SAMMENDRAG</b> .....	<b>6</b>
<b>2. FORKORTELSER</b> .....	<b>8</b>
<b>3. INTRODUKSJON</b> .....	<b>10</b>
<b>4. TEORI</b> .....	<b>17</b>
<b>5. EKSPERIMENTELT</b> .....	<b>26</b>
5.1 KARAKTERISTIKK AV MODELLSUBSTANSENE .....	26
5.2 KJEMIKALIER .....	28
5.3 BIOLOGISKE PRØVER .....	28
5.4 STAMLØSNINGER OG STANDARDLØSNINGER .....	29
5.5 UTSTYR FOR LPME .....	29
5.6 BETINGELSER FOR LPME .....	30
5.7 UTSTYR FOR DESI-MS .....	31
5.8 BETINGELSER FOR DESI-MS .....	31
<b>6. RESULTATER OG DISKUSJON</b> .....	<b>33</b>
6.1 OPTIMALISERING AV DESI-PARAMETRE .....	33
6.1.1 <i>Spraysammensetning</i> .....	33
6.1.2 <i>Sprayflow</i> .....	34
6.1.3 <i>Geometriske parametre</i> .....	34
6.2 INTERN STANDARD .....	38
6.3 FORDYPNINGER VS. FARGESTOFF .....	43
6.4 ULIKE TYPER OVERFLATER TIL Å AVSETTE PRØVEN PÅ .....	46

---

6.5	2-FASEEKSTRAKSJON VS. 3-FASEEKSTRAKSJON .....	48
6.5.1	<i>Ulike organiske løsemidler ved 2-faseekstraksjon</i> .....	48
6.5.2	<i>Ekstraksjonstider</i> .....	49
6.5.3	<i>Praktiske aspekter</i> .....	52
6.6	EKSTRAKSJONSUTBYTTE.....	53
6.7	DETEKSJONSGRENSER.....	54
6.8	STANDARDKURVER.....	58
6.9	UKJENTE PRØVER/PÅLITELIGHETSTEST.....	61
<b>7.</b>	<b>KONKLUSJON</b> .....	<b>66</b>
<b>8.</b>	<b>KILDELISTE</b> .....	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>VEDLEGG</b> .....	<b>71</b>
9.1	KALIBRERINGSKURVER.....	71
9.1.1	<i>Kalibreringskurver prøve 5-7 og prøve 50-55</i> .....	71
9.1.2	<i>Kalibreringskurver prøve 14-28</i> .....	72
9.1.3	<i>Kalibreringskurver prøve 29-40</i> .....	73

## 1. SAMMENDRAG

Væskefase-mikroekstraksjon (Liquid-phase microextraction/LPME) er for første gang kombinert med desorpsjon-elektrosprayionisering for massespektrometri (DESI-MS), som en rask metode for screening av legemidler i urin. Det ble brukt basiske legemidler (amfetamin, buprenorfin, diphenhydramin, haloperidol, loperamid, metadon, metamfetamin, nortriptylin og petidin) som modellsubstanser. Både 2-fase- og 3-fase-LPME ble benyttet i de første forsøkene, senere ble 3-faseekstraksjon valgt som den beste metoden å benytte i videre forsøk. Ved 2-faseekstraksjon, ble modellsubstansene ekstrahert fra 1 mL basisk donorløsning, over en tynn, organisk væskemembran immobilisert i porene på en porøs hulfiber, og videre inn i 10 µL organisk akseptorfase. Ved 3-faseekstraksjon ble modellsubstansene ekstrahert fra 1 mL basisk donorløsning, over en tynn organisk væskemembran immobilisert i porene på en porøs hulfiber, og videre inn i 10 µL vandig, sur akseptorfase. 25 min ble vist å være gunstig ekstraksjonstid for begge systemene. Ekstraktene ble avsatt som dråper på ulike overflatematerialer, der porøs teflon viste seg å være den overflaten som fungerte best. Prøvene ble analysert ved hjelp av DESI-MS, etter fordampning av løsningsmiddelet analyttene var løst i. Det ble gjort forsøk for å finne egnede interne standarder for modellsubstansene. Det ble også gjort forsøk rundt det praktiske arbeidet med avsetting av prøve på teflon, og da spesielt med tanke på systemer for å vite hvor på teflonen prøvene er avsatt, da disse ofte er fargeløse. Å bruke fargestoff til dette formålet, ble sammenlignet med å bruke fordypninger i teflonen, og fargestoff viste seg å være en bedre løsning på problemet.

Det ble bestemt deteksjonsgrenser for modellsubstansene når disse var løst i metanol, løst i urin og ved 3-faseekstraksjon fra urin. Når modellsubstansene var løst i metanol, lå deteksjonsgrensene mellom 0,1 ng/mL for metadon og loperamid, og 10 µg/mL for amfetaminene. Når modellsubstansene var løst i urin, lå deteksjonsgrensene høyere, mellom 0,1 µg/mL for metadon og petidin, og 100 µg/mL for amfetamin. Det ble vist at deteksjonsgrensene ble betraktelig lavere ved bruk av

ekstraksjon før deteksjon. Ved ekstraksjon fra urin, ble deteksjonsgrensene bestemt til 10 ng/mL for metadon og diphenhydramin, og 25 ng/mL for nortriptylin og petidin.

Det ble lagd standardkurver for modellsubstansene petidin, metadon, diphenhydramin og nortriptylin, i konsentrasjonsområdet 100 ng/mL til 2000 ng/mL. Disse testsubstansene ble også brukt til å teste påliteligheten til systemet. Det ble lagd prøver med ulike konsentrasjoner av substansene, og disse ble deretter analysert og sammenlignet med kalibreringskurver, for å kunne gi en kvantitativ bestemmelse. Det viste seg at det var vanskelig å få korrekte resultater av disse forsøkene, og mer forskning må til før kombinasjonen av LPME og DESI-MS kan brukes til kvantitativ bestemmelse. Som en metode til kvalitativ screening av urinprøver, der formålet er å påvise om det er legemiddel i prøven eller ikke, er metoden lovende, da den er rask og effektiv.

## 2. FORKORTELSER

LPME	Liquid-phase microextraction (Væskefase-mikroekstraksjon)
DESI	Desorption-elektrosprayionisering
LLE	Liquid-liquid-extraction (Væske-væskeekstraksjon)
SPE	Solid-phase extraction (Fast-fase-ekstraksjon)
SDME	Single-drop microextraction
MS	Massespektrometri
SLM	Supported liquid membrane
HCl	Hydrochloric acid (saltsyre)
NaOH	Natriumhydroksid
mg	Milligram
µg	Mikrogram
ng	Nanogram
L	Liter
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
rpm	Rotasjoner per minutt
mM	Millimolar
mm	Millimeter



m/s	Meter per sekund
RSD	Relativt standardavvik
<i>m/z</i>	Masse/ladning
SRM	Selektiv reaksjon-modus
V	Volt
kV	Kilovolt

### 3. INTRODUKSJON

Sikker og pålitelig påvisning av legemidler i biologiske prøver er viktig for å arbeide mot trygg legemiddelbruk og innen rusmiddelkontroll. Biologiske prøver benyttes blant annet innen legemiddel-monitorering og ved rusmiddelkontroller og dopingprøver. En utfordring med biologiske prøver er at det i mange tilfeller er lite biologisk materiale tilgjengelig. Dette gjelder spesielt ved analyse av blod- og plasmaprøver. Ved prøvetaking fra barn er det spesielt viktig å kunne klare seg med så lite prøvemateriale som mulig. Ofte er konsentrasjonen av analytt i biologiske prøver for lav til at analytten kan detekteres direkte av analyseapparatet. Ved små prøvevolumer og lave konsentrasjoner er man avhengig av å bruke en prøveopparbeidelsesteknikk som gir en så god oppkonsentrering av analyttene som mulig.

Biologiske prøver er komplekse blandinger som kan inneholde mange hundre ulike stoffer [1]. Mange av stoffene vil kunne interferere med analytten av interesse, og dermed gi et mindre nøyaktig resultat. Eksempel på dette er stoffer som kan danne et kompleks sammen med analytten, og stoffer som kan oksidere eller redusere analytten. Det kan også være stoffer tilstede i prøven som vil gi et signal i analyseapparatet, som ikke kan skilles fra analyttens signal. Ved bruk av massespektrometri gjelder dette stoffer som har samme masse/ladning-forhold ( $m/z$ -verdi) som analytten. En annen grunn til at god opprensing av prøven er viktig, er at biologiske prøver kan inneholde stoffer, eksempelvis proteiner, som kan ødelegge det aktuelle analyseapparatet.

I mange tilfeller er det viktig å få raskt svar på analysene, for eksempel ved monitorering av legemidler med smalt terapeutisk vindu, og ved mistanke om forgiftninger. I dag utføres analysene ofte ved hjelp av tidkrevende teknikker, noe som er en ulempe både på grunn av at det tar lang tid før resultatet på den enkelte prøve foreligger, og på grunn av begrensinger i antall prøver som kan analyseres hver

dag. Dette gjør at det er behov og interesse for raskere metoder for analyse av biologiske prøver. Det satses stort innen forskningsfelt som kan gjøre analysearbeidet raskere og mer effektivt, men en forutsetning for å ta i bruk nyutviklede metoder er at de må være like pålitelige som de tradisjonelle metodene.

Fast-fase-ekstraksjon (SPE) og væske-væske-ekstraksjon (LLE) er tradisjonelle teknikker som har vært mye brukt innen prøveopparbeidelse. Prinsippet for væske-væske-ekstraksjonen er fordelingen et stoff har mellom to væsker som ikke er blandbare med hverandre. Den ene væsken er en vandig fase og den andre er et organisk løsemiddel. Ved bioanalyse vil den vandige fasen være prøveløsningen, en biologisk væske som blod, plasma eller urin. De to ikke-blandbare væskene ristes godt, slik at overflatearealet mellom fasene blir meget stort. På denne måten vil stoffene fra prøveløsningen fordele seg mellom fasene, avhengig av det respektive stoffets egenskaper. Et uionisert, upolart, organisk molekyl (for eksempel et legemiddel) vil tiltrekkes av den organiske fasen, mens polare og ioniserte molekyler vil tiltrekkes av den vandige fasen. Slik kan analytten trekkes ut fra den vandige fasen, og metoden gir god opprensing av prøveløsningen. For å oppnå enda bedre opprensing, kan det, ved hjelp av pH, foretas en tilbakeekstraksjon fra den organiske fasen til en ny vandig fase. Stoffet som ioniseres som følge av valgt pH i den nye vannfasen, vil ekstraheres, mens nøytrale stoffer vil bli igjen i den organiske fasen. Dette er gunstig i situasjoner der legemiddelet er polart og ioniserbart (noe som er tilfelle i de fleste situasjoner der det arbeides med legemidler), og forurensningene er nøytrale, upolare stoffer. Ulempen med å foreta en tilbakeekstraksjon, er at prøveopparbeidelsen blir mer tidkrevende.

Væske-væskeekstraksjon kan også gi oppkonsentrering av analytten, forutsetningen er at volum av organisk fase er mindre enn volum av vandig fase. Dette kan være problematisk å gjennomføre dersom man har små mengder av biologisk prøve tilgjengelig. Andre ulemper med væske-væskeekstraksjon er at metoden er vanskelig å automatisere[1] og at forbruket av organiske løsemidler er stort.

Væskefase-mikroekstraksjon (LPME) ble utviklet på slutten av 1990-tallet[2] og er en relativt ny metode innen bioanalytisk prøveopparbeidelse. Metoden er en miniaturisert versjon av klassisk væske-væskeekstraksjon, og gir god opprensing av prøve og høy oppkonsentrering av analytt(er). Samtidig er LPME en mer miljøvennlig metode enn tradisjonell væske-væskeekstraksjon, på grunn av langt lavere forbruk av organiske løsemidler. Forbruket av organiske løsemidler er typisk 5-30  $\mu\text{L}$  for hver LPME-ekstraksjon [3], mot volum i mL-området for LLE [1].

Utgangspunktet for LPME er ekstraksjonsmetoden ”single-drop microextraction” (SDME), som ble introdusert på midten av 1990-tallet[4]. Ved SDME blir analytt(ene) ekstrahert fra en vandig prøveløsning (donorfase) og inn i en enkelt dråpe organisk løsemiddel (akseptorfase). Dråpen med organisk løsemiddel henger fra spissen av en mikrosprøyte som blir satt ned i den vandige prøven, og systemet blir satt på risting. Ekstraksjonen skjer ved passiv diffusjon, og er basert på analyttens fordelingskoeffisient mellom de to fasene. Den vandige donorfasen har en pH som gjør at analyttene er uioniserte, for å fremme transport av ioniserbare analytter til den organiske fasen. Etter ekstraksjon blir den organiske dråpen trekt inn i mikrosprøyten igjen, og kan analyseres ved hjelp av gaskromatografi. SDME kan også gjøres som et 3-fase-system, med vandig prøve nederst, deretter et tynt lag med organisk løsemiddel, og øverst en vandig mikrodråpe[5]. I slike 3-fasesystemer vil donorfasen ha en pH som gjør at analyttene er i uionisert form, og motsatt vil akseptorfasen ha en pH som fremmer ionisasjon av analyttene. Dette for å hindre tilbakeekstraksjon til den organiske fasen. [6]

Metoden med single-drop microextraction gir god oppkonsentrering på grunn av stor forskjell i fasenes volum. Ekstraksjonen skjer fra donorfasen som har volum i milliliter-området, til en akseptorfase med volum i mikroliter-området. Metoden gir også god opprensing av prøven. Ulempen med metoden er at den er lite robust, det er lett å miste dråpen, spesielt ved kraftig risting.[6] Disse problemene dannet bakgrunnen for å ta i bruk hulfiber som et element i LPME [2]. Ved bruk av hulfiber

blir direkte kontakt mellom donorfase og akseptorfase unngått, og risting og vibrering kan benyttes uten problemer [2].

LPME-ekstraksjon kan utføres som et 2-fasesystem og som et 3-fasesystem [7]. Ved 2-faseekstraksjon blir analyttene ekstrahert fra en vandig donorløsning, via organisk løsemiddel immobilisert i fiberveggene, og videre til organisk akseptorløsning inne i fiberens hulrom. Ved bruk av denne metoden fås det et organisk mikroekstrakt som er direkte kompatibel med gasskromatografi [7]. I en 3-faseekstraksjon blir analyttene ekstrahert fra en vandig donorløsning, via organisk løsemiddel i fiberens porer, og videre til en vandig akseptorløsning inne i fiberen hulrom. Mikroekstraktet er direkte kompatibelt med væskrokromatografi og kapillærelektroforese [7].

pH blir regulert i de ulike fasene i ekstraksjonen, for å favorisere ekstraksjon av de ønskede analytter [6]. Etersom de fleste legemidler er basiske, er det forsket mest på ekstraksjon med tanke på favorisering av basiske substanser. [8-11]LPME-ekstraksjon med pH-gradient er også vist å fungere godt for sure legemidler, som for eksempel ibuprofen [12]. Den gode opprensingen pH-gradienten fører til, er til stor nytte ved ekstraksjon fra biologiske prøver, da blandingen man ekstraherer fra kan være meget kompleks.

Det er blitt vist at LPME fungerer godt ved ekstraksjon både fra plasma [2], urin [2], fullblod [13] og morsmelk [14], og LPME har blitt brukt sammen med analyseteknikker som væskrokromatografi (HPLC), kapillærelektroforese (CE), gasskromatografi (GC) og massespektrometri (MS). [15]

Massespektrometri er en mye brukt analysemetode i forbindelse med analyse av biologiske prøver [1].Metoden gir sikre resultater både for kvalitativ og kvantitativ analyse. Ved bruk av massespektrometri må prøven føres inn i vakuum eller en del av massespektrometeret som er nært vakuumkammeret, for å bli ionisert. [16] Årsaken til at det må være vakuum inne i instrumentet, er at ionene som skal analyseres ikke skal kollideres med luftmolekyler, og dermed dekomponeres. [1].

Massespektrometri kan kombineres med ulike kromatografiske metoder for å gi en separasjon av stoffene i prøven, før den analyseres av massespektrometret. Når gasskromatografi brukes, vil prøven foreligge som en gass når den elueres inn i massespektrometret, og stoffene vil ioniseres under vakuumbetingelser inne i apparatet, ved hjelp av ionisasjonsteknikken elektronionisasjon [1]. Ved bruk av LC-MS (væskekromatografi i kombinasjon med massespektrometri), vil prøven foreligge på væskeform. Da brukes en annen ionisasjonsteknikk, kalt elektropray [1]. Ved bruk av elektropray, ioniseres stoffene før de kommer inn i selve masseanalysatoren. Væskestrømmen fra HPLC-kolonnen passerer gjennom et kapillær, og nitrogengass brukes for å danne aerosol av denne. Det er festet elektroder med høy spenning (2-5 kV) i tilknytning kapillæret, dette gjør at aerosoldråpene som blir dannet får ladning, og slik blir analyttene ionisert under atmosfæretrykk, og før de transporteres inn i masseanalysatoren. [1]

DESI (Desorption ElectroSpray Ionization) er en ioniseringsteknikk som ble introdusert i 2004 [16]. Denne teknikken har fordret stor interesse på grunn av at den gir mulighet til å analysere direkte på en overflate, uten at det er nødvendig å gjennomføre en prøveopparbeidelse på forhånd. Det at teknikken gir mulighet for å unngå eller redusere prøveopparbeidelsestrinnet i en analyse, gjør DESI-MS til en effektiv teknik, som gir mulighet for å analysere et stort antall prøver på kort tid.

Ved DESI brukes elektropray, og som ved vanlig bruk av elektropray, foregår ioniseringen i atmosfæretrykk. [16] Forskjellen på DESI og vanlig elektropray, er at prøven ikke behøver å være i løsning ved DESI. Ved DESI er det ikke selve sprayløsningen som skal analyseres, men en overflate som den elektrisk ladete sprayen rettes mot. Overflaten kan i utgangspunktet være hva som helst, men å avsette flytende prøve på teflon har vist seg å være vellykket, og det er denne overflaten som blir mest brukt [17]. Da avsettes prøven vanligvis som dråper med størrelse i  $\mu\text{L}$ -området. Løsningsmiddelet som analyttene er løst i vil fordampe, og analyttene blir tilbake på overflaten som flekker som så kan analyseres, ved at

elektrosprayen blir sprayet på flekkene. I enkelte tilfeller er det selve overflaten i seg selv som skal analyseres, et eksempel kan være deteksjon av insektsmidler på en frukt [18].

En lang rekke ulike typer substanser, fra små aminosyrer og små legemiddelmolekyler, til store proteiner, har blitt undersøkt ved bruk av DESI-MS [17, 19-22], og det har blitt gjennomført vellykket forskning på biologiske væsker[23, 24] Metoden har vist seg å være spesielt lovende fordi den er aktuell i situasjoner hvor man ikke har mulighet til å gjennomgå en omfattende prøveopparbeidelse, et klassisk eksempel er bruk av DESI-MS i jakten på eksplosiva på flyplasser[16]. DESI-MS har også blitt brukt til *in vivo* analyse, der sprayen ble rettet direkte på en fingertupp til en person som hadde inntatt et legemiddel. Legemiddelmolekylet ble detekterbart på huden 40 minutter etter at det var inntatt.[16].

Det er ingen tvil om at DESI-MS er en analysemetode med et massivt potensiale, som kan gjøre rutinene rundt deteksjon og analyse mye lettere enn det som er tilfellet per dags dato. For at metoden skal kunne bli benyttet i stor skala, er det behov for stor repeterbarhet og at det er automatikk i analysetrinnene. Det er flere geometriske parametre som skal optimaliseres, og studier er gjort på dette.[25, 26] . Posisjonen til elektrosprayen er viktig, da både avstand, og vinkel i forhold til overflaten som skal analyseres spiller en stor rolle. Avstanden fra sprayhodet til kapillæret som fører inn i massespektrometeret, er en annen faktor som påvirker signalkvaliteten [26].

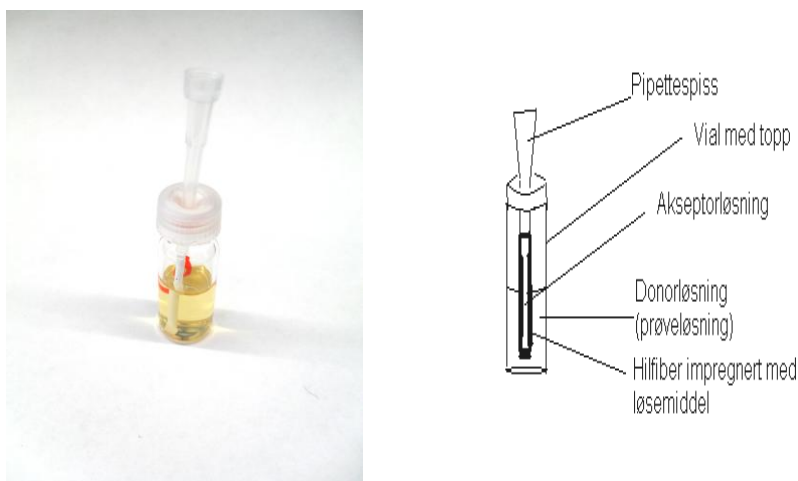
LPME og DESI-MS er ikke tidligere blitt brukt i kombinasjon. En metode som på en vellykket måte kombinerer LPME med DESI-MS har potensiale til å gi store fordeler i analyse av biologiske prøver. Det trengs små volum av biologisk væske, og den gode opprensingen og oppkonsentreringen fra ekstraksjonen bidrar til at lave konsentrasjoner av analytt kan detekteres. Dette er viktig ved påvisning av potente legemidler, som for eksempel buprenorfin. Bruk av DESI gjør at det enkelt kan analyseres mange prøver på kort tid, dette vil kunne øke effektiviteten betraktelig i forhold til det som er praksis i dag.

I denne oppgaven er det sett på fundamentale aspekter ved kombinasjon av de to teknikkene LPME og DESI-MS. Både 2-faseekstraksjoner og 3-faseekstraksjoner er blitt brukt. Valg av løsemidler og ekstraksjonstider er blitt studert, samt ulike typer overflater til å avsette prøvene på. Fokus for oppgaven var å undersøke om LPME i kombinasjon med DESI-MS kan være aktuelt som en metode for screening av biologiske prøver, med tanke på å påvise og identifisere legemidler. Påliteligheten til teknikken har også blitt undersøkt.



## 4. TEORI

Ekstraksjonsenheten for væskefase-mikroekstraksjon er bygd opp av en vial med topp, og en hulfiber festet til en pipettespiss. Figur 1 viser LPME-oppsettet.



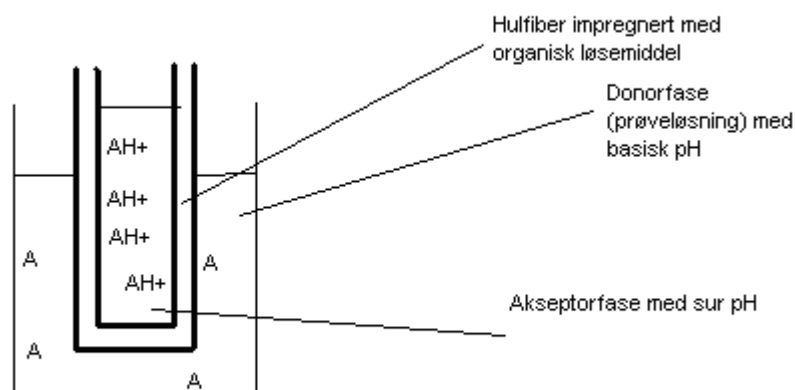
Figur 1; Utstyrsoppsett for væskefase-mikroekstraksjon (LPME).

I væskefase-mikroekstraksjon brukes et organisk løsemiddel til å danne en væskemembran i veggene på en hulfiber. Hulfiberen er porøs og laget av polypropylen [2, 3, 6, 7, 12, 27], og har vanligvis en lengde på 1,5-10 cm [6]. Polypropylen er et gunstig materiale på grunn av at polymeren er kompatibel med en lang rekke organiske løsemidler, og på grunn av at porestørrelsen på 0,2  $\mu\text{m}$  fører til sterk immobilisering av løsemidlene. [28] Organisk løsemiddel immobiliseres i porene på fiberen ved å dyppe hulfiberen i det organiske løsemiddelet, og holde den der i et par sekunder [3]. Kapillærkrefter gjør at løsemiddelet fyller porene på fiberen, og at løsemiddelet vil holde seg i porene når fiberen tas opp av løsemiddelet igjen [3]. Ved hjelp av en mikrosprøyte fylles fiberen enten med mer organisk løsemiddel (2-faseekstraksjon) eller med ny vandig løsning med gunstig pH (3-faseekstraksjon). Det

organiske løsemiddelet som velges kan ikke være blandbart med vandig fase, og som følge av dette vil løsemiddelet holde seg i porene og danne en tynn, organisk væskemembran (SLM) når fiberen overføres til prøveløsningen. Ekstraksjonsenheten settes på risting, og ekstraktet fjernes ved hjelp av en mikrosprøyte ved endt ekstraksjon. Det organiske ekstraktet fra en 2-faseekstraksjon vil kunne injiseres direkte i gasskromatografen, mens et vandig ekstrakt fra en 3-faseekstraksjon vil kunne injiseres direkte i væskrokromatografen [6].

I LPME er prøvevolumene vanligvis mellom 0,1-4 mL [28], men det har blitt brukt volum i området fra 50 µL til over 1 liter [3]. Akseptorfasevolumene er vanligvis mellom 2-30 µL[3]. En stor forskjell i volum mellom de to fasene, vil gi høy oppkonsentrering av analytter.

LPME gjøres mer effektivt ved å utnytte analytten(es) pH-egenskaper. pH i donorfasen justeres slik at analyttene blir uioniserte, og dermed dårlig løselige i denne fasen. For basiske legemidler vil dette si at pH i donorfasen justeres til det basiske området. Denne pH-justeringen vil gjøre at analyttene blir bedre løselige i organisk løsemiddel enn i den vandige donorløsningen, og analyttene vil dermed lettere ekstraheres inn i den organiske fasen som er immobilisert i hulfiber-veggene på fiberen. I en 3-faseekstraksjon vil pH i den vandige akseptorfase justeres slik at ionisering av analyttene fremmes, og for basiske legemidler betyr dette at pH justeres til det sure området. Analyttene ioniseres når de ekstraheres over i akseptorfase, dette gir god løselighet. Denne pH-justeringen hindrer også tilbake-ekstraksjon til den organiske fasen. Figur 2 viser prinsippet for 3-faseekstraksjon av en basisk substans.

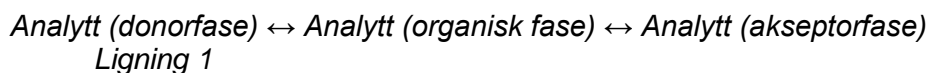


Figur 2; Prinsipp for ekstraksjon av basiske stoffer, fra basisk donorløsning, via organisk fase i hulfiberen, og til sur akseptorfase. A=analytt.

pH-gradienten i systemet bidrar til høyere ekstraksjonsutbytte for analytten(e), i tillegg til god opprensing av prøven. Ved ekstraksjon av basiske legemidler fra basisk donorfase til sur akseptorfase, vil proteiner, salter, nøytrale stoffer, samt sure stoffer forhindres i å bli ekstrahert [9]. Proteiner vil forbli i donorfasen, da disse er for polare til å kunne diffundere inn i den organiske fasen. Salter vil være godt løselige i vandig fase og ikke løselige i organisk fase. Disse vil dermed forbli i donorfasen. Nøytrale stoffer kan deles i to grupper; de polare og de upolare. De polare, nøytrale stoffene vil ha god løselighet i den vandige, polare donorfasen, og dermed ikke ekstraheres. De upolare, nøytrale stoffene, vil ha god løselighet i den organiske fasen. Disse stoffene vil dermed diffundere fra den vandige donorfasen til den organiske fasen. De vil ikke diffundere videre til den vandige akseptorfasen. De sure stoffene i prøven vil ioniseres i den basiske donorfasen. Dette gir god løselighet, og fører til at disse stoffene ikke vil diffundere inn i den organiske fasen. Alt i alt gir dette en selektiv ekstraksjon, der basiske stoffer blir ekstrahert, mens stoffer med andre egenskaper blir forhindret i å komme over i akseptorfase.

Transporten av analytten(e) på tvers av fasene i en mikroekstraksjon skjer ved hjelp av passiv diffusjon [6]. Fordelingen til en analytt avhenger av analyttens

fordelingskoeffisient mellom de ulike fasene, først mellom donorfase og organisk fase, og deretter mellom organisk fase og akseptorfase, dersom systemet er et 3-fasesystem. Likevekten som viser hvordan analytten fordeler seg mellom de tre fasene, kan beskrives slik



Fordelingskoeffisienten  $K_{\text{org/don}}$  uttrykker konsentrasjon av analytt i organisk fase og i donorfase ved likevekt, på denne måten

$$K_{\text{org/don}} = [A]_{\text{org}} / [A]_{\text{don}} \quad \text{Ligning 2}$$

For at ekstraksjonen skal være vellykket er det viktig med en høy verdi for  $K_{\text{org/don}}$ . [29] For stoffer med ioniserbare grupper, kan dette oppnås ved å justere pH i donorløsning slik at ionisering undertrykkes. På tilsvarende måte uttrykkes fordelingskoeffisient  $K_{\text{aks/org}}$  for analytt mellom organisk fase og akseptorfase som vist i ligning 3.

$$K_{\text{aks/org}} = [A]_{\text{aks}} / [A]_{\text{org}} \quad \text{Ligning 3}$$

Høy verdi oppnås ved pH-justering i vandig akseptorfase, slik at ioniserbare stoffer får ladning.

Når den organiske fasen er 1-oktanol, kalles fordelingskoeffisienten log P. 1-oktanol har, med tanke på lipofilitet og evnen til å danne hydrogenbindinger, lignende egenskaper som biologiske membraner. Derfor er log P-verdien av stor nytteverdi for

---

å kunne forutsi hvordan et legemiddel vil fordele seg i kroppen, og spesielt til å forutsi om legemidlet vil være lipofilt nok til å kunne krysse blod-hjerne-barrieren. [1]

Ved en ekstraksjon er det alltid fare for at noe av analyttmengden kan gå tapt. Ekstraksjonsutbyttet (R) beregnes ved hjelp av følgende formel

$$R = (C_e V_e / C_p V_p) * 100\% \qquad \text{Ligning 4}$$

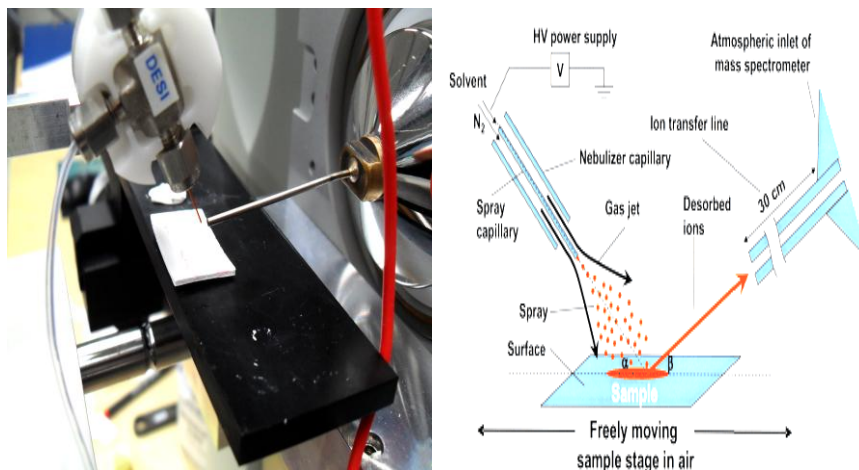
der  $C_e$  og  $C_p$  er konsentrasjon av analytt i henholdsvis ekstrakt etter ekstraksjon og prøve før ekstraksjon, og  $V_e$  og  $V_p$  er ekstraktvolum og prøvevolum. [1]

Oppkonsentrering (E) av analytt som følge av ekstraksjonen, kan beregnes av ligning 5

$$E = C_e / C_p \qquad \text{Ligning 5}$$

Ved analyse av biologisk materiale er det viktig å få en så høy oppkonsentrering som mulig, da legemiddelkonsentrasjoner i blod og urin ofte er så lave at de ikke kan detekteres uten høy oppkonsentrering.

Desorpsjon-elektrospray-ionisering (DESI) er en ioniseringsmetode til bruk ved massespektrometri. Selve DESI-enheten består av en elektrospray som er posisjonert med en viss vinkel i forhold til den overflaten som skal analyseres. Elektrosprayen er plassert tvers ovenfor kapillæret som er inngangen til massespektrometret. Et oppsett er vist i Figur 3.



*Figur 3; Bilde av et DESI-oppsett, med elektropray, overflaten som skal analyseres, og kapillæret som fører inn til massespektrometret. Figuren er et eksempel på et DESI-eksperiment og er hentet fra referanse [16]*

Sprayløsningen oppbevares i en mikrosprøyte, og blir pumpet opp til systemet ved hjelp av en sprøytepumpe. Sammensetningen av sprayen og hastigheten den pumpes med, kan varieres. Hvilke betingelser som fungerer best, avhenger av hva slags type analytter og hva slags type overflate det jobbes med. Sprayløsningen føres via et spraykapillær fra sprøytepumpen til sprayutgangen. Ved utgangen av kapillæret, vil sprayløsningen forstøves og danne en aerosol, ved hjelp av nitrogengass. Nitrogengassen fraktes i et ytre kapillær, som ligger rundt spraykapillæret. Dette gjør at sprayløsningen og gassen kommer i kontakt ved utgangen av de to kapillærene. Det er vanlig at spraykapillæret er litt lengre enn gasskapillæret, som vist på Figur 3. Dette gjør at gassen frigjøres litt lengre oppe i systemet enn sprayløsningen.

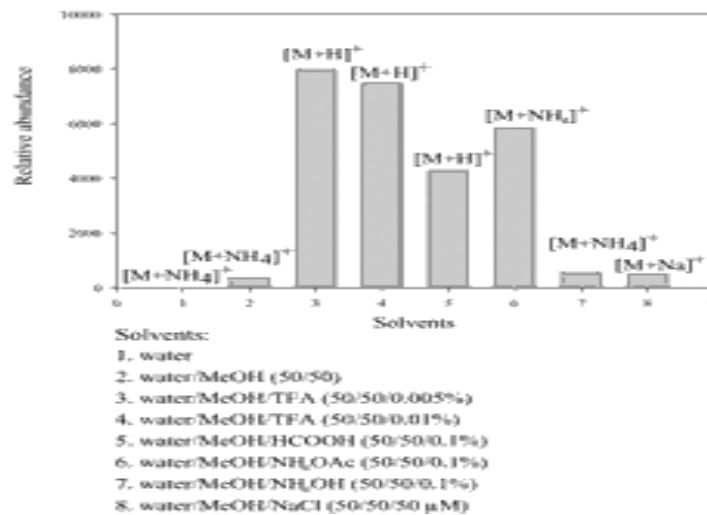
Sprayløsningen har elektrisk ladning. Det er festet en elektrode på sprøytespissen til mikrosprøyten, med en spenning på flere kV. Dette gjør at dråpene som dannes under forstøvningsprosessen, får elektrisk ladning, og denne ladningen vil overføres til

prøven når sprayen treffer overflaten. Overflaten kan være hva som helst, men det er vanlig å bruke en bevegelig plate der man kan feste prøven man vil analysere.

Elektrosprayen består av dråper med diameter under 10  $\mu\text{m}$ , som treffer overflaten med en hastighet i overkant av 100 m/s[30]. De første dråpene fra sprayen fukter overflaten, og danner et filmlag. Analyttene vil desorberes fra prøveflekkene, og løses i dette filmlaget. De dråpene som senere treffer overflaten påvirker filmlaget, og det dannes dråper som beveger seg i retning av MS-kapillæret, grunnet et lavere trykk utenfor kapillæråpningen [31]. Disse dråpene består av sprayvæsken så vel som analytter fra prøveoverflaten. Denne mekanismen som fører til at analytter blir ført inn i massespektrometret, kalles en ”droplet-pick-up”-mekanisme. [30]

Signalets intensitet er sterkt avhengig av geometriske innstillinger ved bruk av DESI-MS. Vinkel og avstand mellom elektrospray-tupp og overflate, og mellom overflate og kapillær er alle faktorer som i høy grad påvirker analysekvaliteten. Dette er innstillinger som må optimaliseres ofte, og ulike analytter kan ha ulike gunstige parametre. [30]

Elektrosprayens sammensetning er også av stor betydning for analysekvaliteten, da polaritet og pH spiller en stor rolle for hvor lett analyttene ioniseres. Dette er vist i Figur 4. Figuren viser tydelig hvor stor forskjell det er i signalintensiteten til et molekylion når det har blitt brukt ulike sprayløsninger.



Figur 4; Signalintensiteten til molekylionet varierer med ulike sprayløsninger. Hentet fra referanse [20]

Når sprayen treffer prøveflekken, vil analytter desorberes fra flekken, og løses i sprayløsningen. Dette er et viktig steg for at analyttene skal kunne transporteres inn i MS-apparatet. Hvor stor del av analyttene som løses i det filmlaget av sprayløsningen som dannes over flekken, er avhengig av spraysammensetning (andel vandig væske og andel organisk væske) og analyttens fordelingskoeffisient.

Hva slags type overflate som brukes til å avsette prøven på, er også av stor betydning for analysekvaliteten. Deteksjonsgrense/kvantifiseringsgrense, signalstabilitet, grad av carryover-effekt, reproduserbarhet og linearitet er alle parametre som påvirkes av hvilken type overflate som er valgt. Overflaten bør være inert i forhold til prøven, det vil si at det ikke bør foregå reaksjoner mellom overflate og analytt. De fysiske bindingene som eventuelt måtte oppstå mellom analytt og overflate, bør være svake slik at analytten lett kan desorberes fra overflaten, under påvirkning av elektro-sprayen. Porøsiteten til overflaten er også av betydning. Ved bruk av for porøse materialer vil prøven kunne diffundere for langt ned i overflaten, og følgelig være vanskelig å detektere. Er overflatematerialet for glatt, vil dette lett føre til at prøven blir vasket bort med sprayen. [17]



Andre parametre som har betydning for intensiteten, er sprayens flow-hastighet, type overflate som blir brukt til å avsette prøven på og spenningen som blir satt på sprayen.[31]

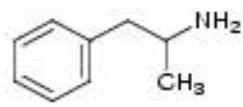
## 5. EKSPERIMENTELT

### 5.1 Karakteristikk av modellsubstansene

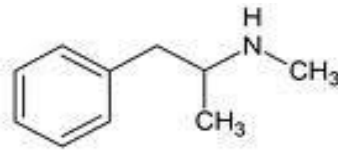
Det ble valgt ut basiske legemidler som modellsubstansene. Flere av legemidlene har misbrukspotensiale, og er derfor aktuelle i forbindelse med screening av urin i forbindelse med rusmiddelkontroll.

Navn	Molekylvekt (Dalton)	pKa	Log P	Molekyl-formel
Amfetamin	135,21	10,1	1,8	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N
Buprenorfin	467,30	8,5 og 10,0	4,98	C <sub>29</sub> H <sub>41</sub> NO <sub>4</sub>
Diphenhydramin	255,16	9,0	3,3	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO
Haloperidol	375,14	8,3	3,23	C <sub>21</sub> H <sub>23</sub> ClFNO <sub>3</sub>
Loperamid	476,22	8,7	5,2	C <sub>29</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Metadon	309,21	8,94	3,93	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO
Metamfetamin	149,12	10,1	2,1	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N
Nortriptylin	263,17	9,7	4,7	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N
Petidin	247,16	8,7	2,7	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>

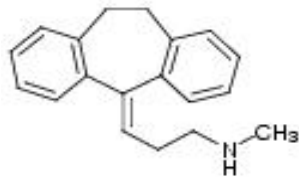
Tabell 1; Modellsubstansenes egenskaper. Verdiene er hentet fra Clark's Analysis of Drugs and Poisons (Pharmaceutical Press, 3. utgave, 2004, London, UK.) og [www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca) (14.05.2010).



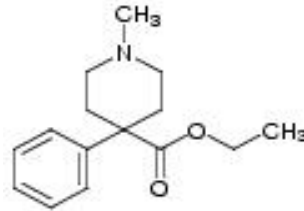
Amfetamin



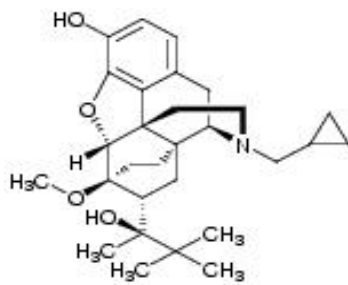
Metamfetamin



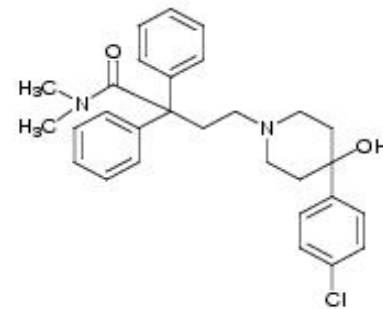
Nortriptylin



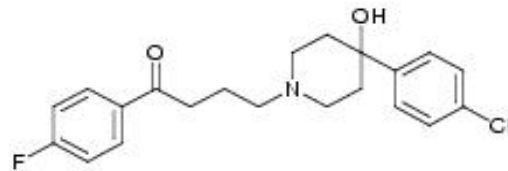
Petidin



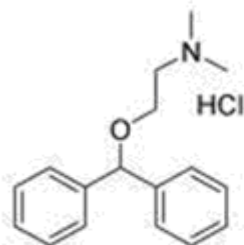
Buprenorfin



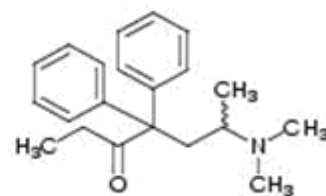
Loperamid



Haloperidol



Diphenhydramin



Metadon

Figur 5; Strukturformler for modellsubstansene.

## 5.2 Kjemikalier

Modellsubstans	Leverandør
Amfetamin sulfat	Gave fra Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo
Buprenorfin hydroklorid	Schering-Plough (Whitehouse Station, NJ,USA)
Diphenhydramin hydroklorid	Dumex (København, Danmark)
Haloperidol hydroklorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Loperamid hydroklorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Metadon hydroklorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Metamfetamin hydroklorid	Gave fra Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo
Nortitylin hydroklorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)
Petidin hydroklorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA)

*Tabell 2; Oversikt over modellsubstansene og leverandører til disse.*

Heptan og heksan kom fra leverandøren Merck (Darmstadt, Tyskland), toluen kom fra AppliChem (Darmstadt, Tyskland), metanol og acetonitril kom fra VWR Bie & Berntsen A/S (Herlev, Danmark). Pentan kom fra Riedel-de Hæn (Buchs, Sveits), mens etylacetat og diklormetan kom fra FLUKA (Buchs, Sveits). 1-oktanol, HCl og NaOH kom fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO,USA).

## 5.3 Biologiske prøver

Det ble samlet inn morgenurin fra frivillige de dagene det skulle gjøres forsøk med urin.

## 5.4 Stamløsninger og standardløsninger

Det ble lagd stamløsninger av alle modellsubstansene. Tørrstoff av substansene ble veid inn og løst i metanol til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Disse ble oppbevart i kjøleskap, beskyttet mot lys. Standardløsningene ble lagd nye hver dag det ble gjort forsøk, ved å fortynne en mengde stamløsning til ønsket konsentrasjon. Fortynningene skjedde i urin, basisk vandig miljø eller metanol, avhengig av hvilke forsøk som skulle utføres. Vandige løsninger ble alltid tilberedt med deionisert vann. Deionisert vann ble rensert til 18,2 M $\Omega$ ·cm i et Milli-Q-vannrensingssystem (Millipore, Billerica, MA, USA).

## 5.5 Utstyr for LPME

Vialene som ble brukt til ekstraksjonene har volum på 1,5 mL (skruelågs-glas 1,5 mL, 32\*11,6 mm) og produseres ved Mikrolab Aarhus A/S (Århus, Danmark). Det ble brukt topper (skruelåg med hul, inlæg:silicone) som også produseres av Mikrolab Aarhus A/S. Vial og topp er vist i Figur 1. Hulfiberen som ble brukt til ekstraksjonene er laget av polypropylen. Fiberen produseres av Membrana (Wuppertal, Tyskland), har indre diameter på 1,2 mm, og porestørrelse på 0,2  $\mu$ m. Det ble brukt en GC-sprøyte (Terumo micro syringe UMS-10) med volum 10  $\mu$ L til fylling av fiber og optrekk av ekstrakt. Ekstraksjonsenheten ble vibrert på VWR VV3 (VWR- Bie & Berntsen A/S, Herlev, Danmark), denne har hastigheter mellom 250-2500 rpm. Det ble brukt eppendorf-pipettespisser på 20  $\mu$ L til ekstraksjonsenheten, levert av Eppendorf Nordic Aps (Horsholm, Danmark).

Etter ekstraksjon ble prøvene avsatt på ulike overflatematerialer. Normal teflon kom fra Rias Plast (Roskilde, Danmark). Porøs teflon kom fra Berghof (Eningen, Tyskland). Denne har en porestørrelse på 25  $\mu$ m, og et porevolum på 47 %. SPE-plater av polypropylen kom fra Biotage (Uppsala, Sverige). Mikroskop-glassplater kom fra VWR Bie & Berntsen A/S (Herlev, Danmark).

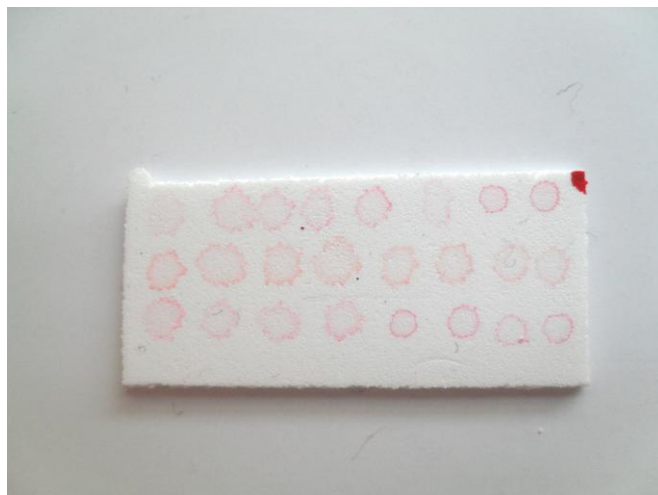
## 5.6 Betingelser for LPME

Det ble brukt prøveløsninger (donorfase) med volum på 1 mL. Per 1 mL donorfase var det iberegnet 40  $\mu\text{L}$  1M NaOH, for at donorfase skulle få en NaOH-konsentrasjon på 40 mM.

Det ble lagd hull i silikonseptumet i hver vialtopp, og en pipettespiss ble tredt gjennom hullet. Pipettespissens nedre del ble klipt av slik at en sprøytespiss kunne passere ned gjennom pipettespissen. Hulfiberen ble delt opp i 2 cm lange biter. En hulfiberbit ble festet til enden av pipettespissen ved hjelp av en loddebolt. Hulfiberen ble lukket i nedre del ved hjelp av en tang slik at hulrommet inne i fiberen ikke kom i direkte kontakt med miljøet utenfor fiberen.

Ved ekstraksjon ble hulfiberen dyppet ned i organisk løsemiddel, og slik ble det organiske løsemiddelet immobilisert i fiberens porer. Hulfiberen ble deretter fylt med 10  $\mu\text{L}$  akseptorfase, ved hjelp av en mikrosprøyte. Ved 2-faseekstraksjon ble det samme løsemiddelet som ble brukt til immobilisering av fiberen, brukt som akseptorfase. Dette løsemiddelet var som oftest toluen. Ved 3-faseekstraksjon ble det brukt 10 mM HCl som akseptorfase. Etter fylling av akseptorfase i fiberens hulrom, ble fiberen overført til vialen med prøveløsning, og toppen ble skrudd igjen. Ekstraksjonsenheten ble så satt på risting, med hastighet 1125 rpm. Etter ekstraksjon ble ekstraktet tatt ut ved hjelp av en mikrosprøyte.

Det ble brukt ulike overflatematerialer til å avsette prøvene på (kapittel 6.4), men som oftest ble det brukt porøs teflon. Ekstraktet ble avsatt som dråper på 1  $\mu\text{L}$ , på toppen av 1  $\mu\text{L}$  utørket fargestoff-løsning (se Figur 6). Det var ca 3 mm mellom dråpene. Dråpene lufttørket, og ble deretter analysert ved hjelp av DESI-MS.



*Figur 6; Fargestoffløsning og prøveløsning er avsatt som 1  $\mu$ l-dråper på porøs teflon.*

## 5.7 Utstyr for DESI-MS

Prøvene ble analysert ved bruk av en Thermo Scientific LTQ XL lineær ion trap (København, Danmark). Det var festet en DESI-enhet til massespektrometeret, denne enheten var bygd ved Institut for farmaci og analytisk kemi, Københavns universitet. DESI-enheten kunne styres manuelt i tre dimensjoner. Dataprogrammet Xalibur (Thermo Scientific, København, Danmark) ble brukt til å behandle datafilene fra massespektrometeret. Det ble brukt en KDS-100-CE, KD Scientific-sprøytepumpe (Holliston, MA, USA) og gasstette Hamilton-sprøyter (Bonaduz, Sveits) til sprayløsningen.

## 5.8 Betingelser for DESI-MS

Platen med prøver ble festet til DESI-enheten ved hjelp av tack-it heftemasse. Prøvene ble analysert ved at platen ble manuelt bevegde i horisontal retning, mens spray og MS-kapillær var i ro. Slik ble prøveflekkene scannet fra én side av flekken til den andre. Sprøyten var posisjonert 60 ° i forhold til platen (se Figur 3).

Det ble testet ulike sprayløsninger (kapittel 6.1.1), og løsningen ble pumpet inn i systemet ved hjelp av en sprøytepumpe, som oftest med hastighet 6  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nitrogengass ble brukt for å gi aerosoldannelse av sprayen, gasstrykket som ble brukt var 8,5 bar. Det ble brukt elektroder for å gi sprayen ladning, spenningsforskjellen var på 5 kV. Temperaturen på kapillæret inn i MS-apparatet var 350 °C, og kapillærspenningen var 3 volt. Antall microscans var 1.

I fullscan-modus ble det scannet i  $m/z$ -området 100-500. I de forsøkene det ble brukt MS/MS, ble det brukt fragmenteringsenergier som vist i Tabell 3. Verdiene for energi representerer antall % av maksimalt oppnåelig energi. Energiene er valgt etter å ha optimalisert fragmenteringen slik at molekylionet har en signalintensitet på 10-20 % i forhold til hovedfragmentet.

<b>Modellsubstans</b>	<b>Molekylion (<math>m/z</math>)</b>	<b>Fragment (<math>m/z</math>)</b>	<b>Energi</b>
Amfetamin	136	119	17
Buprenorfin	468	414	12
Diphenhydramin	256	167	26
Haloperidol	376	165	20
Loperamid	477	266	18
Metadon	310	265	15
Metamfetamin	150	119	22
Nortriptylin	264	233	20
Petidin	248	220	30

*Tabell 3; Oversikt over modellsubstansenes molekylion, samt hovedfragment, og energi som ble brukt i MS/MS-modus.*



## 6. RESULTATER OG DISKUSJON

### 6.1 Optimalisering av DESI-parametre

#### 6.1.1 Spraysammensetning

Spraysammensetningen er av stor betydning for signalets intensitet, som vist i en studie av Kauppila et al.[20], og som beskrevet i kapittel 4. Ulike spraysammensetninger ble testet i begynnelsen av arbeidet med denne oppgaven. Amfetamin ble brukt som modellsubstans, og sprayløsningene ble rangert etter hvor lav amfetaminkonsentrasjon som var detekterbar. Av de ulike sammensetningene nevnt i Tabell 4, ga sammensetningen Acetonitril:H<sub>2</sub>O 50:50 de høyeste signalene for amfetamin, og denne sammensetningen ble valgt til videre arbeid.

Spraysammensetning	Laveste detekterbare amfetaminkonsentrasjon
Metanol:H <sub>2</sub> O 90:10	1 µg/mL
Acetonitril:H <sub>2</sub> O 90:10	1 µg/mL
Metanol:H <sub>2</sub> O:Maursyre 50:50:0,5 %	10 µg/mL
Etanol:H <sub>2</sub> O 50:50	1 µg/mL
Acetonitril:H <sub>2</sub> O 50:50	0,1 µg/mL
Metanol:H <sub>2</sub> O:Maursyre 90:10:0,5 %	10 µg/mL

*Tabell 4; Ulike spraysammensetninger som ble testet ut, og laveste detekterbare konsentrasjon av amfetamin.*

Senere ble det byttet til en ny spraysammensetning; en blanding av metanol, vann og maursyre i forholdet 80:20:0,5, da denne viste seg å gi høyere signalintensitet for alle

aktuelle analytter. Forsøkene i kapittel 6.6, 6.8 og 6.9 er utført med denne spraysammensetningen.

### **6.1.2 Sprayflow**

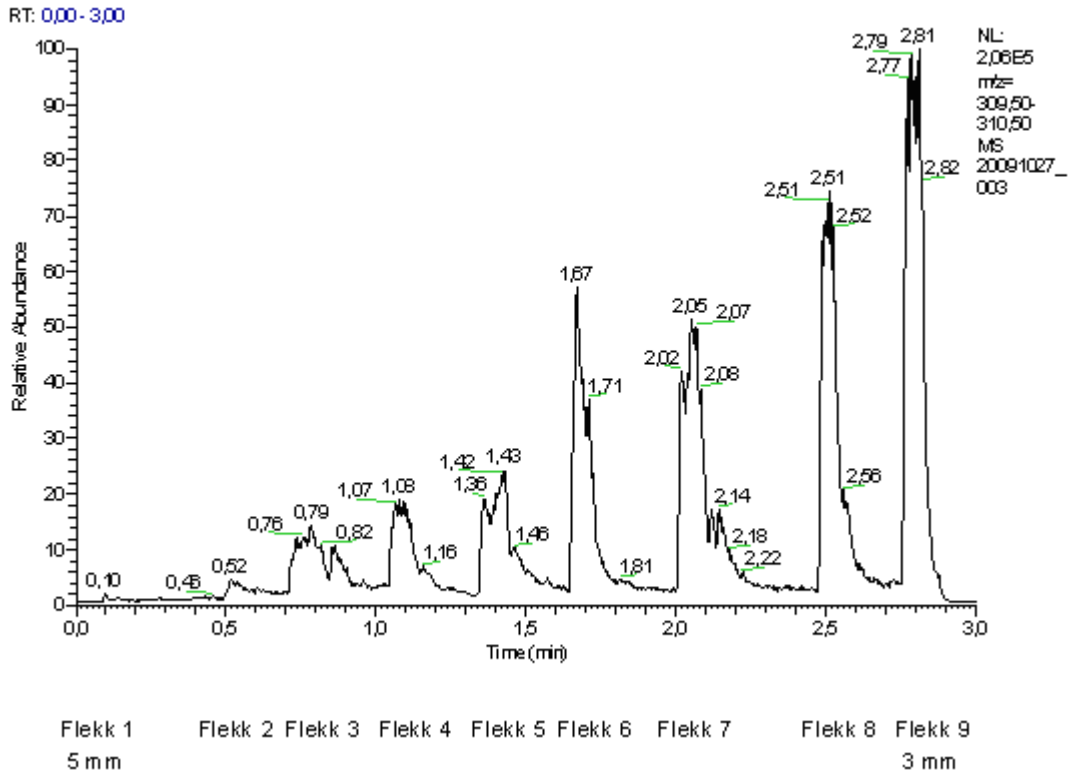
Flowhastigheter fra 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  til 12  $\mu\text{L}/\text{min}$  ble testet til bruk sammen med porøs teflon. Signalene ble større ved økning i flow opptil 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ , men ved flow større enn 8  $\mu\text{L}/\text{min}$  ble teflonen våt, noe som førte til stor carryover-effekt. Carryover er en effekt som kommer av at sprayen og filmlaget på overflaten danner en aerosoleffekt som vasker prøvemateriale bort fra prøveflekken til områder rundt flekken eller til neste prøveflekk. Sprayflow på 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  ble valgt til videre arbeid, på grunn av gode signaler og lite carryover.

### **6.1.3 Geometriske parametre**

De geometriske innstillingene er av stor betydning for deteksjonen, og det er små forskjeller i innstillingene som skal til for å endre kvaliteten på deteksjonen. Både avstanden mellom spray og prøve, og mellom spray og MS-kapillær, er parametre som bør optimaliseres for å få gode resultater.

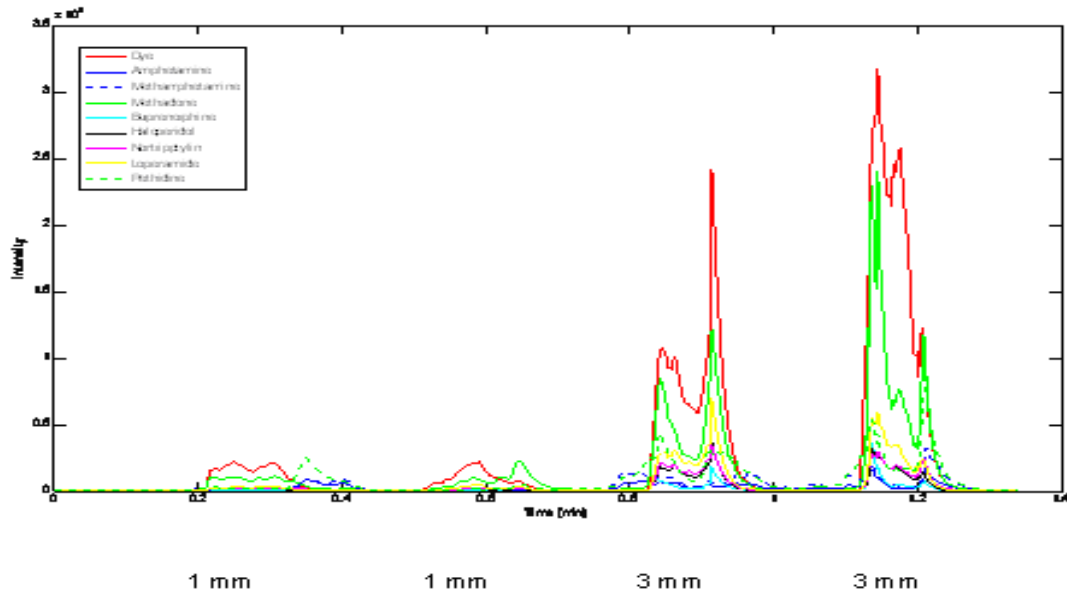
Under arbeidet med denne oppgaven, ble det brukt en bevegelig plate til å feste teflonplaten på (se Figur 3). Denne bevegelige platen var noe bøyd i loddrett retning, slik at det var kortere avstand mellom sprayen og flekkene lengst til høyre på teflonplaten, sammenlignet med avstanden mellom sprayen og flekkene lengst til venstre på teflonen. Dette var noe det måtte justeres manuelt for underveis i en scan, ved å senke eller heve platen, for å få høyest mulig signaler, og for at alle prøveflekkene skulle scannes med like betingelser. Figur 7 viser hvor forskjellige signalene for metadon ble når det ikke ble justert for at platen var bøyd, underveis i scannen. I utgangspunktet var avstanden mellom sprayen og plata ca 5 mm, og platens helling gjorde at forskjellen i høyde fra start til slutt var ca 2 mm. Figuren viser tydelig at signalene ble mye høyere mot slutten av scannen, altså når avstanden

mellom spray og plate var ca 3 mm. Dette var en scan over 9 flekker totalt, men som vist i figuren, var de to første flekkene ikke detekterbare.



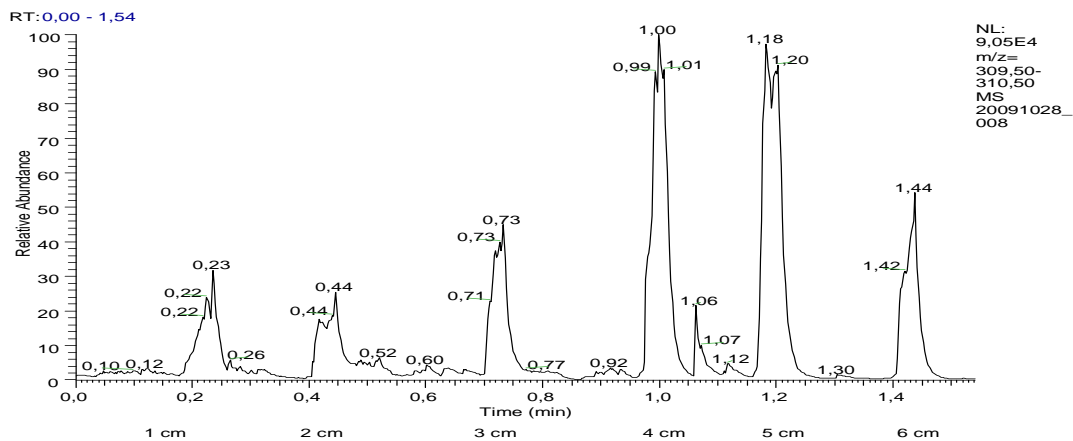
*Figur 7; Scan over 9 flekker, der sprayen ved starten var hevet 5 mm over teflonen. Avstanden sank kontinuerlig underveis i scannen, og ved siste flekk var sprayen ca 3 mm over platen. Signalene ble målt på molekylionet for metadon, m/z 310.*

Signalintensiteten sank også når sprayen var veldig nærme teflonplaten, som vist i Figur 8. Ved scan over de to første flekkene på plata, var sprayen veldig nærme overflaten (mindre enn 1 mm). Da sprayen ble hevet til 3 mm, økte intensiteten betraktelig. Ut fra Figur 7 og Figur 8, kan det konkluderes med at optimal avstand mellom spray og teflonplate var 2-3 mm.



Figur 8; Effekt av sprayhøyde. Sprayen var hevet 1 mm over prøveplaten i de to første flekkene, og 3 mm over prøveplaten i de to siste flekkene.

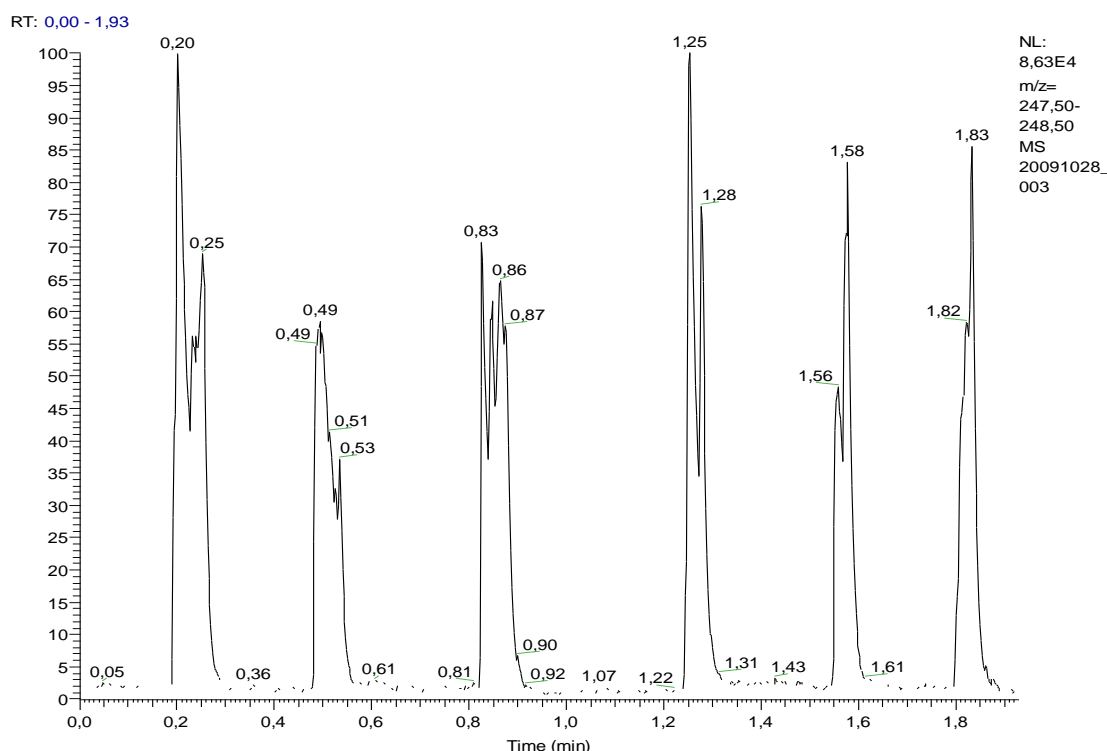
Det ble også undersøkt hvordan avstanden fra flekkene på teflonplata til MS-kapillæret påvirker resultatet. Dette er avstanden ionene må passere gjennom luft i atmosfæretrykk før de når inngangen til massespektrometret. I en scan over 6 flekker ble avstanden økt fra 1 mm for den første flekken til 6 mm for den siste flekken. Resultatet for metadon er vist i Figur 9.



Figur 9; De 6 flekkene er detektert med ulik avstand fra flekk til MS-kapillær, med 1 mm for første flekk og 6 mm for siste flekk.

Metadon ble best detektert når det var avstand på 4-5 mm mellom flekk og MS-kapillær.

Selv med like geometriske betingelser, vil det være en viss variasjon i signalene fra flekk til flekk. Dette er vist i Figur 10. Figuren viser en scan over 6 flekker med 10 µg/ml petidin i toluen, og selv om betingelsene for deteksjonen var de samme for alle flekkene, fikk signalene ulike intensiteter.



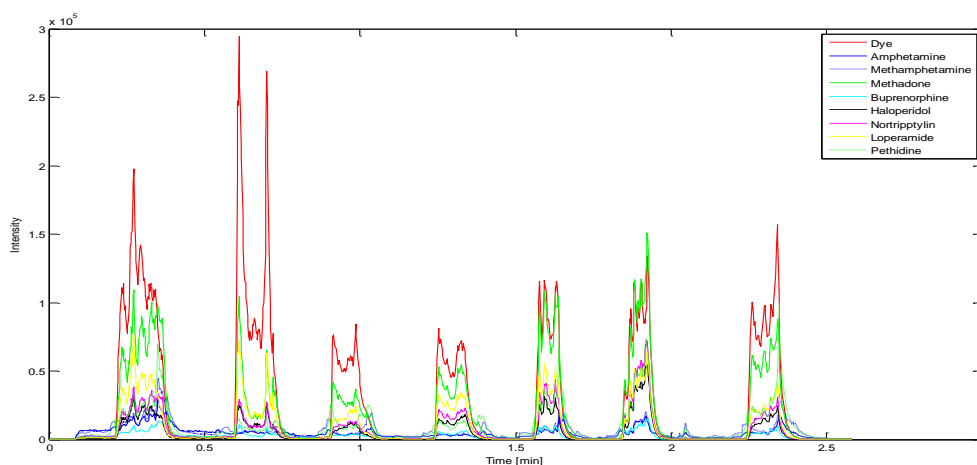
Figur 10; Kronogram over 6 flekker med 10 µg/ml petidin i toluen. De geometriske betingelsene var like for alle flekkene.

Ved bruk av DESI er det flere faktorer som styres manuelt (for eksempel sprayretning og scan-hastighet), derfor vil det alltid være noe variasjon i signalene som blir generert, selv om flekkene inneholder samme konsentrasjon av analyttene. Det jobbes med å få på plass automatiske styringsteknikker, for å gjøre resultatene mer reproducerbare.

## 6.2 Intern standard

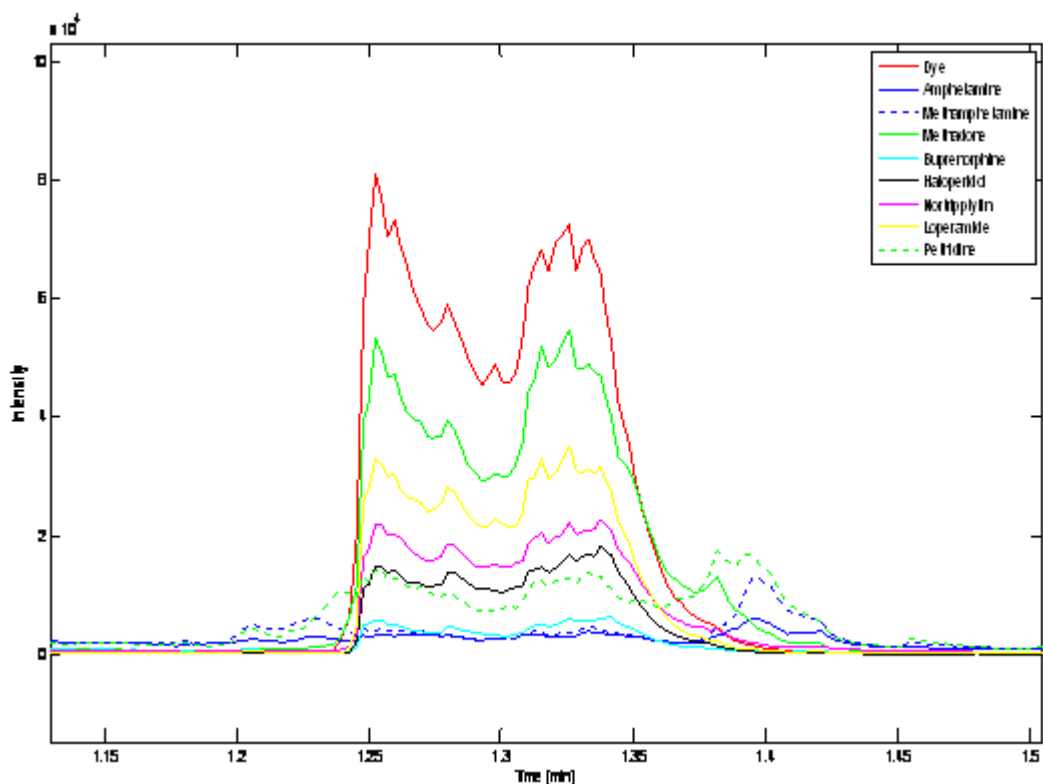
Som nevnt i forrige kapittel (6.1.3), vil det alltid være variasjoner i signalene fra flekker som inneholder lik konsentrasjon av analytt(er), ved bruk av manuell styring av DESI-MS. Manuell styring innebærer også at analysens kvalitet i en viss grad avhenger av hvem som utfører den, da det kan være forskjeller i hvordan to personer styrer DESI-enheten (for eksempel med tanke på hastigheten prøve-overflaten har, når den blir beveget under sprayen). I arbeidet med denne oppgaven, ble det derfor lagt stor vekt på å finne egnede interne standarder til modellsubstansene. Å ta i bruk intern standard er også viktig for å få pålitelige resultater fra ekstraksjonene.

Den interne standarden bør være så lik analytten som mulig. Grunnen til dette er at små variasjoner i analysene bør gi likt utslag for analytt og intern standard. I arbeidet med å finne passende interne standarder for de ulike analyttene, ble det undersøkt hvordan de ulike modellsubstansene fordeler seg innad i dråpen når den tørker. Like tørkemønste på prøveavsettings-overflaten gir lik oppførsel ved DESI-deteksjonen, på grunn av at sprayen passerer over flekken fra den ene siden av flekken til den andre. Figur 11 viser en scan over 7 flekker der modellsubstansene ble løst i vandig, basisk miljø i en konsentrasjon på 10 µg/mL.



Figur 11; Figuren viser hvordan signalene varierer for hver enkelt modellsubstans, fra flekk til flekk.

Hver modellsubstans er markert med hver sin farge. Figuren viser at både absolutt signalintensitet og forholdet mellom de ulike substanssignalene varierte. Det var derfor ikke mulig å bruke én av substansene som intern standard for alle de andre. Det ble deretter undersøkt om noen av substansene oppførte seg mer likt enn de andre. Figur 12 er en forstørrelse av topp nr.4 i Figur 11.



Figur 12; Forstørrelse av topp nr.4 fra Figur 11. Figuren viser at modellsubstansene kan deles i to grupper etter hvordan de fordeler seg innad i flekken.

Av figuren forstås det at analyttene kunne deles i to grupper, ut fra hvordan de tørker på teflonplata, og oppførsel under DESI-deteksjon. Tre av analyttene skilte seg ut fra de andre, disse tre er amfetamin, metamfetamin og petidin. Signalene for disse tre starter før og varer lengre enn signalene for de øvrige analyttene (toppens ”skuldre”). Dette ga informasjon om analyttenes oppførsel når prøvedråpen tørket på teflonplaten. Amfetamin, metamfetamin og petidin så ut til å fordele seg i dråpens ytterkanter, og dette gir de nevnte ”skuldrene” på signalet. De øvrige analyttene så ut til å være mer eller mindre sentrert i midten av dråpen etter tørking.

Det ble gjort 2-fase- og 3-fase-ekstraksjoner fra vandig, basisk miljø og fra urin. Både det vandige miljøet og urinen ble gjort basisk til 40 mM NaOH, og analyttkonsentrasjon i donorfase var 10 µg/mL. Hver modellsubstans ble testet ut som intern standard for alle de andre modellsubstansene, ved å se hvordan ratio signalintensitet analytt/signalintensitet intern standard varierte fra flekk til flekk. Dersom to modellsubstanser oppførte seg likt hverandre fra analyse til analyse, ville dette gi liten variasjon i ratio analytt/intern standard og dermed gi lave standardavvik. Ekstraksjonene ble utført to ganger, på ulike dager, for å få to uavhengige sett. For hvert sett ble det utført 3 prøveparalleller, og avsatt 3 flekker fra hver parallell. Relative standardavvik ble beregnet, og slik kunne det forstås hvilke substanser som lignet hverandre i oppførsel. Tabell 5 viser relative standardavvik mellom de ulike parallellene ved 2-faseekstraksjon fra vandig, basisk miljø.

Analytt	Amfetamin	Metamfetamin	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Buprenorfin	Loperamid
Inetern Standard								
Amfetamin								
Metamfetamin								
Petidin			0	69,7%	42,3%	67,3%	76,2%	50,8%
Nortriptylin			53,4%	0	32,6%	27,8%	29,1%	58,5%
Metadon			49,1%	29,1%	0	29,2%	40,1%	27,5%
Haloperidol			63,2%	31,4%	26%	0	<b>15,1%</b>	27,4%
Buprenorfin			77,6%	39,9%	37,6%	<b>15,5%</b>	0	42,7%
Loperamid			60,6%	37,3%	27,8%	<b>19,0%</b>	29,3%	0

*Tabell 5; Relativt standardavvik for gjennomsnittsratio analytt/intern standard for 6 paralleller ved 2-faseekstraksjon fra vandig, basisk miljø. Det var ikke mulig å detektere amfetamin og metamfetamin i disse forsøkene.*

Tabell 5 viser at haloperidol og buprenorfin lignet hverandre i oppførsel fra parallell til parallell, dette gir de laveste standardavvikene. Relative standardavvik under 20 % er markert med uthevet skrift.



Tabell 6 viser relative standardavvik mellom de ulike parallellene ved 2-faseekstraksjon fra urin.

Analytt	Amfetamin	Metamfetamin	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Buprenorfin	Loperamid
Intern Standard								
Amfetamin								
Metamfetamin								
Petidin			0	30,5%	31,0%	37,9%		42,1%
Nortriptylin			30,3%	0	22,0%	<b>13,7%</b>		34,9%
Metadon			32,4%	<b>19,1%</b>	0	<b>19,7%</b>		<b>19,9%</b>
Haloperidol			31,4%	<b>13,5%</b>	20,1%	0		34,0%
Buprenorfin								
Loperamid			44,8%	36,1%	21,3%	34,9%		0

*Tabell 6; Relativt standardavvik for gjennomsnittsratio analytt/intern standard for 6 paralleller ved 2-faseekstraksjon fra urin. Det var ikke mulig å detektere amfetamin, metamfetamin og buprenorfin i disse forsøkene.*

Ved 2-faseekstraksjon fra urin, kan det sees at metadon fungerte godt som intern standard for nortriptylin, haloperidol og loperamid. Dette tyder på at disse 4 modellsubstansene kan ligne hverandre i oppførsel under deteksjonen. Dette gjenspeiler seg også i Figur 12, som viser at disse 4 har noe like tørkemønstre.

Tabell 7 viser de relative standardavvikene ved 3-faseekstraksjon fra vandig, basisk miljø.

Analytt	Amfetamin	Metamfetamin	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Buprenorfin	Loperamid
Intern Standard								
Amfetamin	0	23,1%	62,2%	37,9%	67,3%	60,0%	96,6%	81,4%
Metamfetamin	<b>16,9%</b>	0	50,6%	30,0%	49,7%	57,5%	102,5%	80,0%

## RESULTATER OG DISKUSJON

Petidin	45,9%	44,4%	0	33,0%	<b>16,0%</b>	58,3%	90,7%	154,9%
Nortriptylin	34,1%	26,4%	29,4%	0	30,3%	30,2%	79,7%	69,5%
Metadon	44,1%	38,4%	<b>15,8%</b>	25,3%	0	43,6%	82,3%	95,8%
Haloperidol	55,3%	48,4%	30,2%	27,0%	30,5%	0	60,0%	45,3%
Buprenorfin	173,6%	162,4%	161,2%	150,0%	145,6%	138,4%	0	92,5%
Loperamid	73,1%	61,6%	53,2%	47,8%	48,4%	35,1%	70,6%	0

*Tabell 7; Relativt standardavvik for gjennomsnittsratio analytt/intern standard for 6 paralleller ved **3-faseekstraksjon fra vandig, basisk miljø.***

Verdiene i Tabell 7 viser at amfetamin og metamfetamin fungerte godt som intern standard for hverandre. Det samme gjaldt for petidin og metadon.

Ved 3-faseekstraksjon fra urin, var det kun ét standardavvik under 20 %, dette var tilfellet når amfetamin ble brukt som intern standard for metamfetamin.

Analytt	Amfetamin	Metamfetamin	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Buprenorfin	Loperamid
Intern Standard								
Amfetamin	0	<b>18,7%</b>	80,2%	107,9%	90,3%	128,4%		132,5%
Metamfetamin	25,0%	0	73,8%	102,2%	84,7%	123,7%		129,5%
Petidin	79,8%	87,9%	0	46,8%	35,0%	79,1%		93,4%
Nortriptylin	118,5%	129,4%	46,7%	0	48,2%	67,4%		78,3%
Metadon	91,5%	80,7%	43,0%	77,5%	0	128,3%		120,0%
Haloperidol	148,7%	156,4%	68,4%	55,8%	78,9%	0		41,2%
Buprenorfin								

*fortsettelse fra forrige side*

Loperamid	131,6%	143,7%	100,4%	62,2%	78,2%	71,1%		0
-----------	--------	--------	--------	-------	-------	-------	--	---

---

*Tabell 8; Relativt standardavvik for gjennomsnittsratio analytt/intern standard ved 3-faseekstraksjon fra urin. Burprenorfin var ikke detekterbar i forsøkene.*

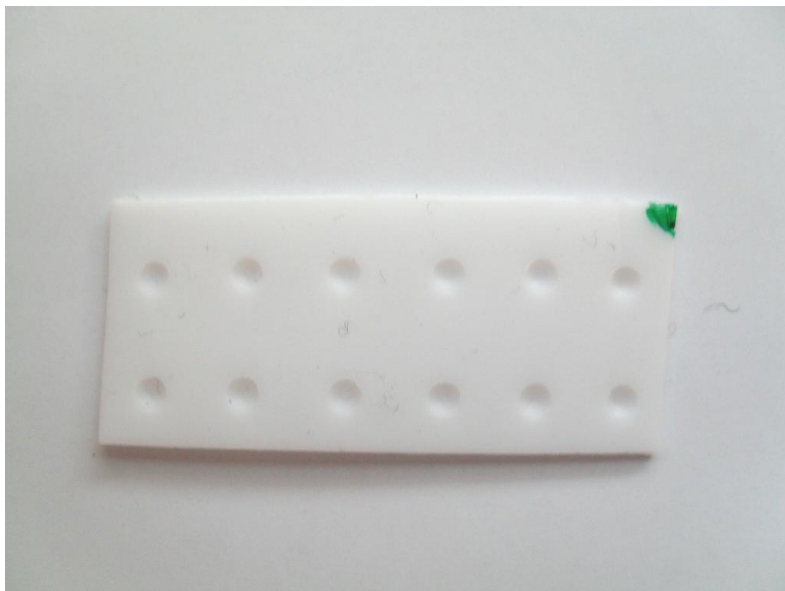
På grunnlag av forsøkene som ble gjort, ble metamfetamin valgt som intern standard for amfetamin og petidin, mens nortriptylin ble valgt som intern standard for haloperidol, metadon, buprenorfin og loperamid. Det ble lagt mer vekt på figurene som viser tørkemønstrene og fordelingen av de ulike analyttene innad i flekkene, enn de relative standardavvikene, i bestemmelsen av interne standarder og markører.

### 6.3 Fordypninger vs. Fargestoff

Ved bruk av analysemetoden DESI-MS er den vanligste prosedyren at prøvene som skal analyseres avsettes som små flekker (volum er typisk 1  $\mu\text{L}$ ) på en overflate (som beskrevet i kapittel 5.6). Prøvene er i vandig løsning eller løst i organisk løsemiddel og kan analyseres ved hjelp av DESI-MS når væsken har fordampet. Ved bruk av væskefase-mikroekstraksjon, vil prøvene være fargeløse (på grunn av at den vandige akseptorløsningen er fargeløs), og det er derfor nødvendig med en eller annen form for visuell markør for å kunne se hvor på overflaten prøvene er avsatt. Fargestoffet Rhodamin 6G løst i metanol ble brukt til dette, da ble det først avsatt en 1  $\mu\text{L}$  dråpe av fargestoff-løsningen. Umiddelbart etter ble det avsatt en 1  $\mu\text{L}$  dråpe av ekstraktet, slik at de to dråpene ble blandet på prøveavsettings-overflaten. Det var et poeng at de to dråpene ble godt blandet, slik at fargestoffet ble en god markør for nøyaktig hvor analyttene befant seg. Fargestoff løst i metanol fungerte relativt bra når prøven som skulle avsettes var vandig, men et problem kunne være at fargen fikk ulik styrke på flekkene som avsettes. Mulige grunner til dette kan være at fargestoffet ikke løste seg fullstendig i metanolen, eller at fargestoffet hadde større affinitet til sprøyten eller pipetten den ble påsatt med, enn til overflaten som skulle brukes. En annen ulempe med å bruke fargestoffdråper, er at det da ble avsatt 2  $\mu\text{L}$  tilsammen i stedet for kun 1  $\mu\text{L}$ . Dette ga lengre tørketid av dråpen, og det gikk dermed lengre tid før prøven kunne analyseres ved bruk av DESI-MS.

Fargestoff løst i metanol kunne ikke brukes når ekstraktet var en toluenløsning, som var tilfellet i arbeidet med 2-faseekstraksjoner. I dette tilfellet ville fargen samle seg som en liten prikk i en del av flekken, og det var umulig å vite hvor prøven var avsatt, og hvor stor flekken egentlig var. Dette skjedde fordi fargestoffet som har blitt brukt, ikke er løselig i toluen.

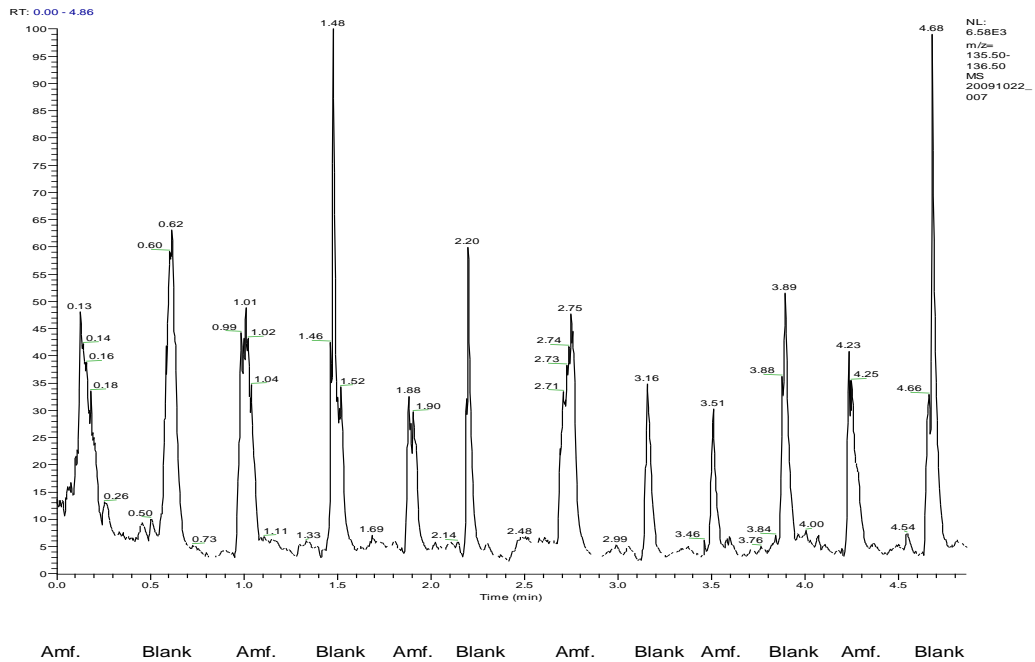
Som et alternativ til å bruke fargestoff som markør for å lokalisere hvor på platen ekstraktet var avsatt, ble det undersøkt om fordypninger i teflonen kunne gjøre arbeidet lettere. Det ble lagd ”brønner”, små fordypninger med en dybde på 1 mm, i vanlig, glatt teflon, se Figur 13. Fordypningene ble lagd ved hjelp av et tynt borr.



*Figur 13; Teflonplate med fordypninger der prøve kan avsettes.*

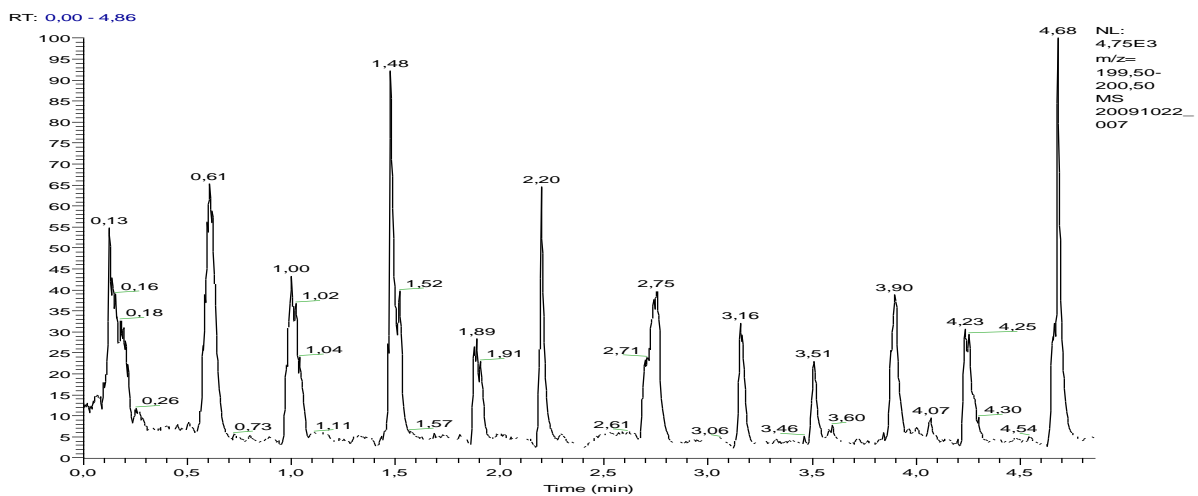
Vanlig teflon er vaskbart, og dette ga mulighet for å kunne bruke samme teflonplate flere ganger. En butt mikrosprøyte ble brukt til å avsette 1  $\mu\text{L}$  ekstrakt i fordypningene. På denne måten kunne bruk av fargestoff unngås, og det var samtidig lett å lokalisere ekstraktet. Det var en stor fordel å avsette kun én dråpe, sammenlignet med å avsette to dråper, der ekstraktdråpen måtte avsettes på toppen av fargedråpen, og det før fargedråpen hadde tørket.

Ulempen med brønnene var at de ga store bakgrunnssignaler, som vist i Figur 14. Figuren viser en scan der det har blitt brukt en teflonplate med 12 fordypninger. 1  $\mu\text{L}$  dråpe med 10  $\mu\text{g/mL}$  av modellsubstansene ble avsatt i annenhver fordypning, det vil si fordypning nr 1, 3, 5, 7, 9 og 11. Figur 14 viser  $m/z$ -verdi 136, som er amfetamins  $m/z$ -verdi. Det er tydelig av figuren at fordypningene ga så store bakgrunnssignaler i seg selv at det ikke var mulig å stole på resultatene.



Figur 14; Figuren viser signaler på  $m/z$  136, som er amfetamins  $m/z$ -verdi. Prøveløsning er avsatt i annenhver fordypning, med konsentrasjon 10  $\mu\text{g/ml}$ .

De høye signalene fra de tomme brønnene skyldtes neppe carryover-effekt fra brønnene med innhold. Det kunne konkluderes med dette, på grunn av at det samme signalmønsteret gikk igjen også for andre  $m/z$ -verdier enn modellsubstansenes  $m/z$ -verdier. Ved å se på vilkårlige  $m/z$ -verdier, kunne det sees at også her var det høye signaler fra brønnene, som for eksempel den vilkårlige  $m/z$ -verdien 200, som vist i Figur 15. Ingen av modellsubstansene har  $m/z$ -verdier på 200, og det samme mønsteret gikk igjen også på andre vilkårlige  $m/z$ -verdier som ble undersøkt.



Figur 15; Kronogram for  $m/z$ -verdi 200, en vilkårlig masse. Ingen av modellsubstansene har denne  $m/z$ -verdien.

På bakgrunn av dette ble det konkludert med at fargestoff var en bedre løsning enn fordypninger, selv om det krevde mer arbeid og tørketiden ble lengre.

## 6.4 Ulike typer overflater til å avsette prøven på

I arbeidet med denne oppgaven ble det testet ut ulike overflater; vanlig teflon, porøs teflon, glass, og polypropylen.

Polypropylen var for porøst til å kunne brukes til prøveavsetning. De store porene gjorde at prøven forsvant ned i materialet, og dette gjorde det vanskelig å detektere analyttene på overflaten.

Det ble testet hvordan det fungerte å avsette prøver på glass. Dette fungerte dårlig, grunnet at glass er et glatt materiale og dette ga stor carryover-effekt. En annen praktisk ulempe med glass er at materialet ikke kan klippes, slik som teflon kan. Muligheten til å kunne klippe til egnede størrelser og fasonger av overflatematerialet er en stor fordel i arbeidet med DESI-MS, på grunn av liten plass mellom spray og MS-kapillær og at systemet er svært sensitivt i forhold til geometriske parametre.

Vanlig teflon ga gode signaler og var lett å håndtere. Den glatte overflaten kan imidlertid lett kan gi carryover-effekt. På grunn av at vanlig teflon er et glatt og uporøst materiale, vil all sprayløsningen legge seg som et lag på overflaten, noe som lett kan vaske bort deler av prøveflekken. Sprayflow på 6  $\mu\text{L}/\text{min}$  ga stor carryover-effekt, og sprayflowen måtte derfor reduseres til 4  $\mu\text{L}/\text{min}$  ved bruk av vanlig teflon. Den glatte overflaten førte også til lengre tørketider enn det som var tilfellet med mer porøse materialer.

Porøs teflon har en ru overflate sammenlignet med vanlig, glatt teflon. Dette reduserer mengden prøve som blir vasket bort av sprayen, og mindre carryover gir smalere topper. Porøs teflon er også blitt vist å gi mindre krysskontaminering mellom prøver, i tillegg til høyere sensitivitet og signalstabilitet sammenlignet med andre type overflater. [17] Porøs teflon er et hydrofobt materiale, og dette kan by på problemer dersom prøven som skal avsettes er vandig. I slike tilfeller vil det være vanskelig å avsette prøvedråpen, fordi det skjer en frastøtning mellom den vandige, hydrofile dråpen og den hydrofobe overflaten. Da vil prøvedråpen bli hengende på sprøytespissen som brukes til avsetning, i stedet for å avsettes på teflonen. I denne oppgaven ble dette praktiske problemet løst ved hjelp av fargestoffet som var løst i metanol. På grunn av at det først ble avsatt en dråpe fargestoffløsning som prøvedråpen deretter ble blandet med, ble hydrofilisiteten til den totale

prøve+fargestoff-dråpen senket, og overflatespenningen mellom dråpen og teflonen ble redusert. Porøs teflon fungerte godt og ble brukt i videre arbeid.

## 6.5 2-faseekstraksjon vs. 3-faseekstraksjon

### 6.5.1 Ulike organiske løsemidler ved 2-faseekstraksjon

Det ble prøvd ut ulike organiske løsemidler ved milli-LLE (væske-væskeekstraksjon). Amfetamin, metamfetamin, metadon og buprenorfin ble brukt som modellsubstanser til dette. 0,5 mL vandig løsning med konsentrasjon 10 µg/mL av analyttene, ble ekstrahert med 0,5 mL organisk fase. Høyeste signalintensitet for hver modellsubstans ble notert og gjennomsnitt av 4 paralleller ble beregnet. Tabell 9 viser hvordan signalintensiteten til hver modellsubstans varierer med ulike løsemidler.

	Heksan	Pentan	Etylacetat	Diklormetan	Heksan	Toluen
Amfetamin	725	843	899	544	3380	8500
Metamfetamin	2830	4240	2370	885	5700	36000
Metadon	19800	41700	27400	7120	56000	311000
Buprenorfin	2650	4380	40600	1700	2680	9366

*Tabell 9; Organiske løsemidler som ble prøvd ut i 2-fase LPME, og gjennomsnittssignal-signalintensitet for modellsubstansene.*

Toluen ble valgt til videre arbeid, på grunn av gode signaler, og av praktiske årsaker. Toluen gjør fiberen gjennomsiktig, noe som praktisk sett var en stor fordel. At fiberen var gjennomsiktig, førte til at det var mye lettere å ha kontroll på om det la seg luftbobler i bunnen av fiberen, noe som var et praktisk problem ved fylling av akseptorløsning ned i fiberen. Det kan også være en fordel med gjennomsiktig fiber ved opptrekking av ekstrakt fra hulrommet i fiberen, etter ekstraksjon. Når fiberen var gjennomsiktig, var det lettere å ha kontroll på sprøytespissen og hvor langt ned i



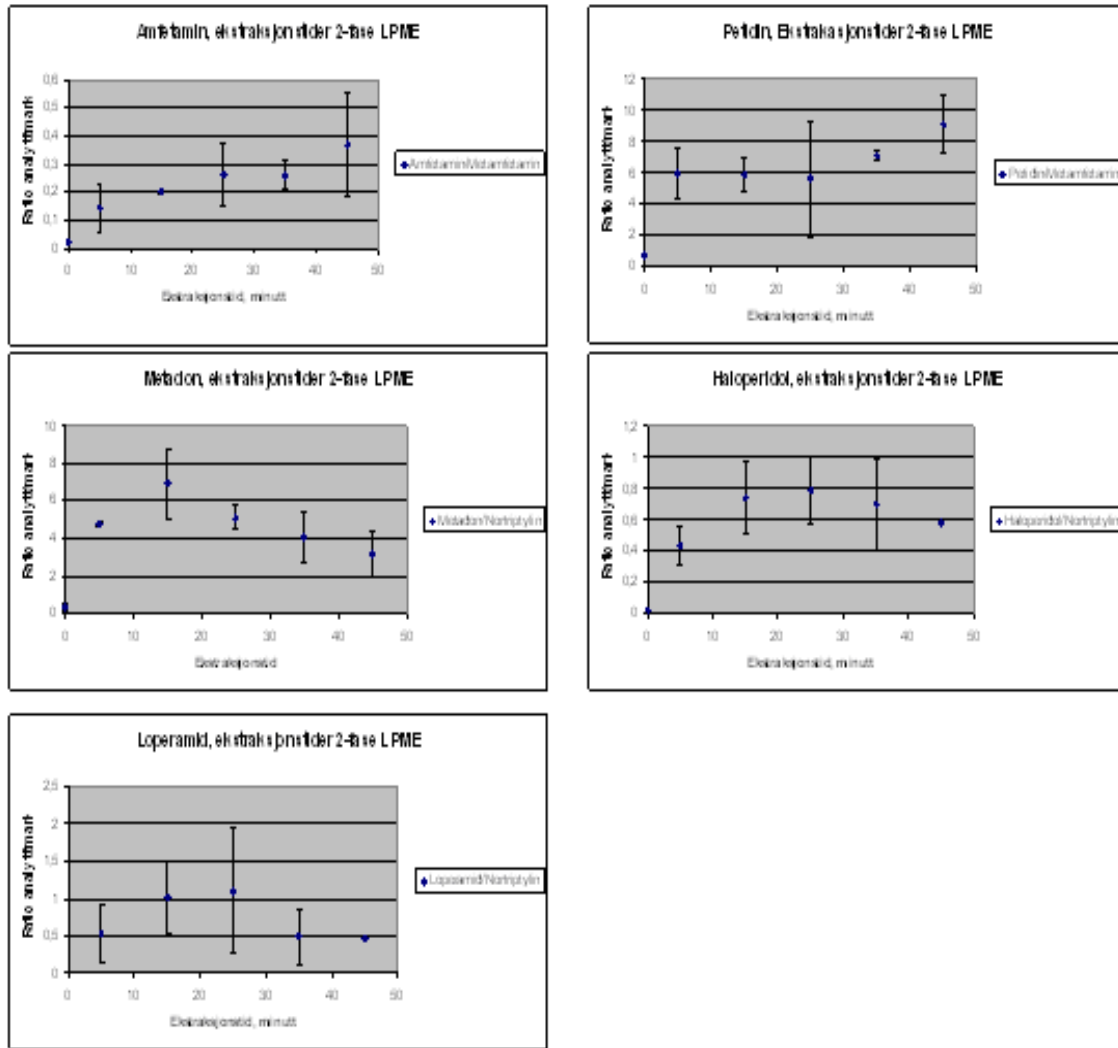
fibren denne gikk. Dersom sprøytespissen blir stukket for langt ned i fibren, kan spissen stikke hull i nedre del av fibren, og akseptorfase lekker ut i donorfase. Da er ekstraksjonen mislykket. En annen fordel med toluen er kort tørketid (1  $\mu\text{L}$  dråpe tørket på ca 1 min). Dette ga muligheten for raske analyser der det var kort tidsrom mellom ekstraksjon og deteksjon.

### 6.5.2 Ekstraksjonstider

Det ble testet for ulike ekstraksjonstider både på 2-faseekstraksjon og 3-faseekstraksjon fra urin, for å finne optimal ekstraksjonstid for modellsubstansene. Amfetamin, petidin, metadon, haloperidol og loperamid ble brukt som analytter. Signalene fra disse analyttene ble korrigert i forhold til signalene fra to kontrollsubstanser, metamfetamin og nortriptylin. Amfetamin og petidin ble korrigert i forhold til mertamfetamin, og metadon, haloperidol og loperamid ble korrigert i forhold til nortriptylin. De to kontrollsubstansene ble løst i toluen til bruk ved 2-faseekstraksjon, og i 10 mM HCl til bruk ved 3-faseekstraksjon. Konsentrasjonen i disse løsningene var 10  $\mu\text{g/mL}$ . 1  $\mu\text{L}$  dråpe av kontrollsubstans-løsning ble tilsatt som en egen dråpe på teflonplaten. 1  $\mu\text{L}$  dråpe av ekstrakt ble tilsatt på toppen av kontrollsubstans-løsningen, slik at disse to dråpene ble blandet. På denne måten var kontrollsubstansene uavhengige av ekstraksjonene, og de justerte for forskjeller som måtte være i deteksjonen fra flekk til flekk.

Blank urin ble spiket med 10  $\mu\text{g/mL}$  av analyttene, og prøvene ble ekstrahert i henholdsvis 0-5-15-25-35-45 minutter. To blanke urinprøver ble også ekstrahert i 45 min, som kontroll på at andre stoffer i urinprøvene ikke påvirket resultatet. Det ble ekstrahert 2 prøveparalleller på hvert tidspunkt, og avsatt 4 flekker fra hver vial. Dette ga altså 8 flekker fra hver ekstraksjonstid.

Ved 2-faseekstraksjon ble toluen brukt som organisk løsemiddel (akseptorfase), og ekstraksjonstidkurver for 2-fase LPME er vist i Figur 16.

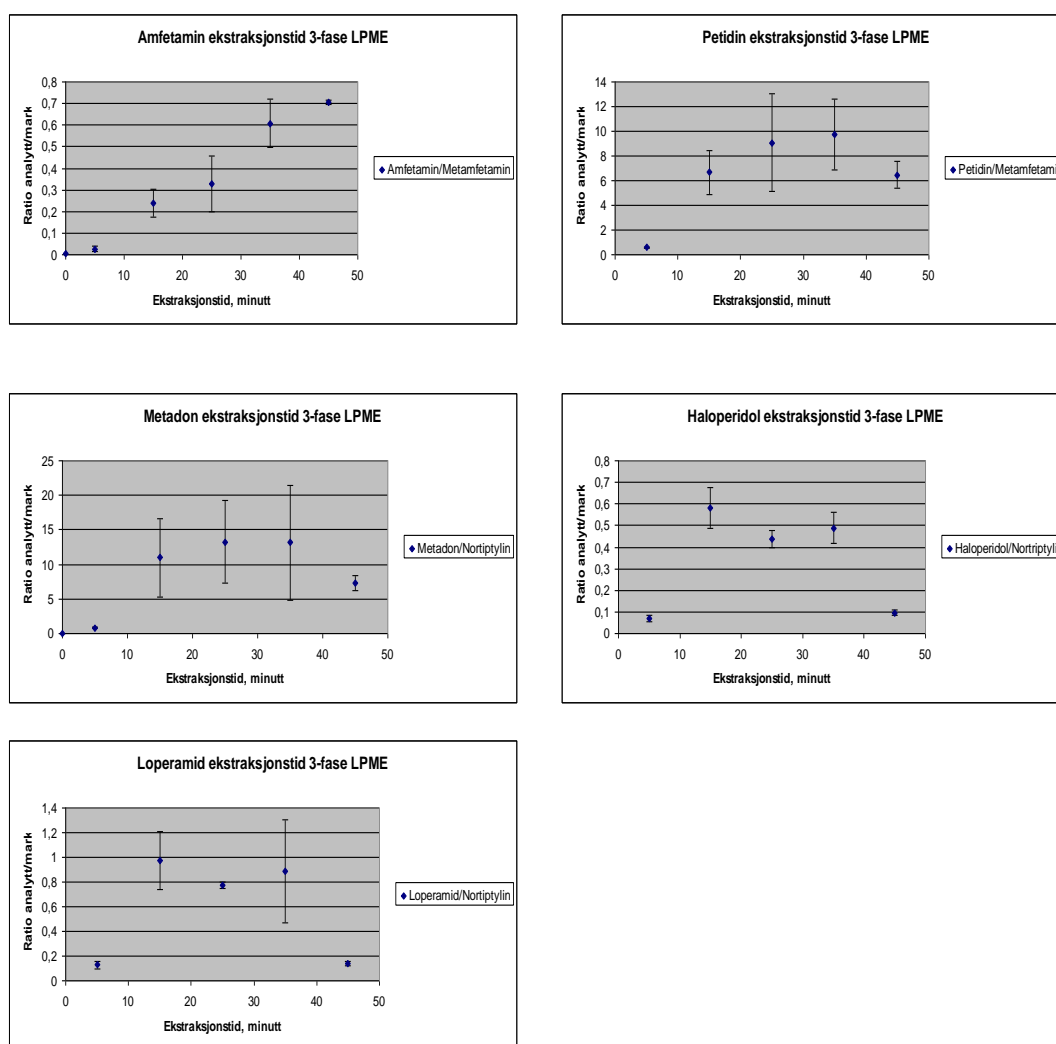


Figur 16; Ekstraksjonstider 2-fase-LPME for analyttene amfetamin, petidin, metadon, haloperidol og loperamid.

Kurvene viser ulike tendenser for de ulike analyttene. Amfetamins signal steg gjennom hele tidsspekteret. Dette kan tyde på at det trengs lengre ekstraksjonstid enn 45 minutter før amfetamin når likevekt. For petidin var det vanskelig å trekke en konklusjon, på grunn av uklare tendenser i kurven.

Også for de andre analyttene er bildet noe usikkert, da disse kurvene viser at ratio mellom analytt og kontrollsubstans sank etter en viss ekstraksjonstid. Årsaken til dette er ikke kjent. Felles for de tre kurvene er at de stiger frem til 15-25 minutter, og på grunnlag av dette ble 25 minutter valgt som ekstraksjonstid for 2-fase LPME.

Tendensen var noe den samme for 3-faseekstraksjonene (se Figur 17). 3-faseekstraksjonene ble utført med 1-oktanol som organisk løsemiddel og 10 mM HCl som akseptorfase. Amfetamin viste en stigning i utbytte for hele tidsspekteret, og det er derfor grunn til å tro at likevekt ikke var innstilt etter 45 min. De andre kurvene synker etterhvert (etter 25-35 min), og som et kompromiss ble det bestemt at videre arbeid med 3-fase LPME skulle utføres med ekstraksjonstider på 25 minutter.



Figur 17; Ekstraksjonstider for 3-fase-ekstraksjoner av amfetamin, petidin, metadon, haloperidol og loperamid.

### 6.5.3 Praktiske aspekter

Ved 2-fase-ekstraksjoner, ble toluen valgt som det mest egnede løsemiddelet (6.5.1). Fordelen med toluen var at det er et løsemiddel som gjør fiberen gjennomsiktig, og dette gjorde det praktiske arbeidet med fylling av fiber og opptrekking av ekstrakt, mer kontrollerbart, som nevnt i et kapittel ovenfor (6.5.1). Toluene ga også de høyeste signalintensitetene for modellsubstansene.

En ulempe med toluen var at det er meget flyktig løsemiddel, og dette krever at det arbeides raskt. Dette var spesielt viktig ved avsetting av flekker på teflonen, da skal ekstraktdråpen blandes med fargestoffdråpen, som ved 2-faseekstraksjon også vil være en toluenløsning. Rask fordampning av toluen krever at det går minst mulig tid fra vialen blir tatt av ekstraksjonen til dråpen blir satt på teflonen. Dersom mye av toluenen har fordampet fra fiberen før akseptorløsningen blir trekt opp i sprøyten, vil det skje en oppkonsentrering av analyttene. Ved bruk av intern standard vil denne korrigeres for oppkonsentreringen, men ved bruk av kontrollsubstanser som tilsettes etter ekstraksjonen, noe som var tilfellet i arbeidet med å finne optimale ekstraksjonstider (6.5.2), vil en høy oppkonsentrering etter at ekstraksjonen er ferdig gi uttrykk for at ekstraksjonen ga større utbytte enn det den egentlig har gjort.

Toluen fordamper svært raskt (ca 1 minutt) etter at en 1  $\mu\text{L}$ -dråpe blir plassert på teflonplaten. Vandige ekstrakter, som var tilfellet etter en 3-fase-ekstraksjon, har mye lengre tørketid, ca 45 min. Det er selvfølgelig en fordel med kort tørketid, men så kort tørketid som 1 minutt kunne gi praktiske problemer når det var snakk om mange prøver som fortløpende skulle tas av risting og avsettes på teflon.

En annen faktor å ta hensyn til i valget mellom 2-fase- eller 3-faseekstraksjon, var størrelsen på flekkene som ble avsatt på teflonen. Som nevnt tidligere, er teflon en hydrofob overflate. Det organiske ekstraktet fra en 2-faseekstraksjon er også hydrofob og vil ha stor tiltrekning til teflonen. For en dråpe fra et vandig ekstrakt vil overflatespenningen være mye større. En 1  $\mu\text{L}$  dråpe fra en 2-faseekstraksjon vil

dermed fordele seg over et mye større område på teflonen enn det en dråpe fra en 3-faseekstraksjon vil. Det er en fordel at dråpen samler seg på et konsentrert område, da dette gir en bedre deteksjon og smalere topper i kronogrammet. Dette, sammen med faktorer nevnt tidligere i teksten, bidro til at det ble valgt å jobbe videre med 3-fase LPME.

## 6.6 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbytte ble bestemt for modellsubstansene petidin, diphenhydramin, nortriptylin og metadon. I disse forsøke ble haloperidol brukt som en kontrollsubstans for samtlige modellsubstanser, for å justere for forskjeller som måtte oppstå i deteksjonen på DESI-MS.

Ekstraksjonene ble utført med spiket urin som donorfase. Urinen ble gjort basisk (40 mM), og spiket med modellsubstansene til konsentrasjon 0,5 µg/mL. Organisk fase var 1-oktanol, og 10 mM HCl ble brukt som akseptorfase. Det ble lagd 3 prøveparalleller, og ekstraksjonene pågikk i 25 minutter.

Prøvene som ble ekstrahert ble sammenlignet med prøver som ikke ble ekstrahert. Sistnevnte prøver ble lagd i 10 mM saltsyre, med konsentrasjon 50 µg/mL av modellsubstansene. Disse prøvene var altså 100 ganger så konsentrerte som prøvene som skulle bli ekstrahert. Som en følge av at det også var en faktor på 100 i forskjell på volum mellom donorfase (1 mL) og akseptorfase (10 µL) i ekstraksjonen, tilsier dette at signalene fra de ekstraherte og de ikke-ekstraherte prøvene skulle bli like store, dersom utbyttet ble 100 %. Alle signaler ble justert i forhold til haloperidols signal. Markøren ble tilsatt som en egen 1 µL-dråpe til hver prøveflekk, med konsentrasjon 100 µg/mL. Resultater vises i Tabell 10.

Petidin	22 %
Diphenhydramin	34 %
Nortriptylin	14 %
Metadon	33 %

Tabell 10; Ekstraksjonsutbytter for de 4 modellsubstansene.

Det kan tenkes at en viss mengde av analyttene ble igjen i den organiske fasen som var immobilisert i hulfiberveggene. Det vil alltid foreligge en likevekt mellom ionisert form av analytten i akseptorfasen, og uionisert form av analytten i den organiske fasen. Spesielt for legemidler med høy log P, vil dette kunne tenkes å utgjøre et tap av analytt under ekstraksjonen. Av de 4 modellsubstansene som det ble bestemt ekstraksjonsutbytte for i dette arbeidet, var det nortriptylin som hadde høyest log P-verdi (4,7), og som dermed var mest hydrofob. Dette kan tenkes å forklare at nortriptylin ble funnet å ha den laveste verdien for utbytte, 14 %. Mengde organisk fase som immobiliseres i porene på den 2 cm lange fiberbiten, ble funnet ved å veie fiberen før og umiddelbart etter dypping i organisk løsemiddel (1-oktanol). Det ble utført 6 paralleller, og beregningene viste at gjennomsnittsmengden som blir immobilisert i hulfiberen er 19,4  $\mu\text{L}$ .

Søk i litteraturen viser at det tidligere har blitt rapportert høyere utbytter for metadon, petidin og nortriptylin. Bruk av 3-fase LPME med ekstraksjonstid 30 min ga 70-80 % utbytte for disse legemidlene i en studie av Gjeldstad et. al.[32] .

## 6.7 Deteksjonsgrenser

I forhold til alt kvantitativt og semikvantitativt arbeid med biologiske prøver, er det viktig å kjenne til deteksjonsgrensene til den substansen eller de substansene det arbeides med. Deteksjonsgrensen til en substans varierer med ulike prøvemedium, og med ulike prøveopparbeidelsesteknikker. I denne oppgaven ble deteksjonsgrenser for

legemidlene bestemt ved løsninger i metanol, løsninger i urin, og ved ekstraksjon fra urin.

Deteksjonsgrensen ble satt til den konsentrasjonen der signal/støy=3. Det vil si at topphøyden måtte være minst 3 ganger så stor som høyden på støyen. Prøvene ble analysert ved bruk av SRM-modus (MS/MS), se Tabell 3 for hvilke betingelser som ble brukt til dette.

For deteksjon av legemidler løst i metanol, ble det lagd en fortynningsrekke med konsentrasjoner på 10, 1, 0,1 , 0,001 , 0,0001 og 0,00001 µg/mL. Løsningen ble avsatt som flekker på porøs teflon, og det ble brukt Rhodamin 6G løst i metanol for å vite hvor flekkene er avsatt.

Det ble scannet 5 flekker for hvert legemiddel og for hver konsentrasjon. For hver flekk ble tidspunktet sprayen ble beveget inn over flekken, og tidspunktet sprayen ble beveget av flekken, notert.

Deteksjonsgrenser for de 8 modellsubstansene løst i metanol er vist i Tabell 11.

Amfetamin	10 µg/mL
Metamfetamin	10 µg/mL
Buprenorfin	0,1 µg/mL
Metadon	0,0001 µg/mL
Petidin	0,001 µg/mL
Haloperidol	0,001 µg/mL
Nortriptylin	0,001 µg/mL
Loperamid	0,0001 µg/mL

Tabell 11; Deteksjonsgrenser (µg/mL) for legemidlene løst i metanol

Som vist i tabellen, hadde amfetaminene de høyeste deteksjonsgrensene (10 µg/mL). Dette stemmer overens med det øvrige arbeidet i denne oppgaven, da det har vist seg flere ganger at disse to substansene var de vanskeligste å detektere. Dette kan være på grunn av at amfetaminene har en viss flyktighet, og at disse fordamper under prøvedråpens tørketid.

Legemidlene ble løst i urin, og prøvene ble sammenlignet med blank urin. Deteksjonsgrensene er gjengitt i Tabell 12.

Amfetamin	100 µg/mL
Metamfetamin	10 µg/mL
Metadon	0,1 µg/mL
Petidin	0,1 µg/mL
Haloperidol	1 µg/mL
Nortriptylin	1 µg/mL
Loperamid	1 µg/mL

*Tabell 12; Deteksjonsgrenser (µg/mL) for legemidler løst i urin.*

Deteksjonsgrensene var høyere når modellsubstansene var løst i urin enn når de var løst i metanol. Dette kom trolig av matrikseffekter i urin. Urin er en kompleks blanding av stoffer som kan interferere med analyttene og dermed gi lavere signal av disse. Den komplekse blandingen vil trolig også føre til høyere støysignal fra urinen.

Det ble bestemt deteksjonsgrenser ved 3-fase ekstraksjon fra urin for substansene diphenhydramin, metadon, petidin og nortriptylin. Det ble brukt morgenurin fra tre personer. Av disse ble det lagd 3 fortynningsrekker, én fra hver urinprøve, med konsentrasjonene 100 ng/mL-50 ng/mL-25 ng/mL-10 ng/mL, oppsettet er vist i



Tabell 13. Det ble også ekstrahert fra blanke urinprøver, og alle signalene fra prøvene ble sammenlignet med signal fra blank ekstraksjon fra samme urin.

	Konsentrasjon (ng/mL)	Konsentrasjon (ng/mL)	Konsentrasjon (ng/mL)	Konsentrasjon (ng/mL)
Diphenhydramin	10	25	50	100
Metadon	10	25	50	100
Petidin	10	25	50	100
Nortriptylin	10	25	50	100

Tabell 13; Oppsett for forsøket for å bestemme deteksjonsgrenser ved LPME fra urin.

Som kriterie ble det satt at alle tre parallellene måtte være over deteksjonsgrensen, for at signalet skal regnes som positivt for den aktuelle konsentrasjonen. Resultater for deteksjonsforsøket er vist i Tabell 14.

Metadon	10 ng/mL
Petidin	25 ng/mL
Diphenhydramin	10 ng/mL
Nortriptylin	25 ng/mL

Tabell 14; Deteksjonsgrenser (ng/mL) for legemidler ekstrahert fra urin ved LPME.

En sammenligning av Tabell 12 og Tabell 14, viser at deteksjonsgrensen ble vesentlig lavere (10-100 ganger) ved ekstraksjon av urinprøvene. Dette kommer trolig av en

kombinasjon av oppkonsentrering av analyttene ved ekstraksjon, og at rene ekstrakter ikke inneholder andre stoffer i urinprøven som eventuelt kan interferere med analytten (matrikseffekt).

Søk i litteraturen viser at det i en tidligere studie har blitt fastsatt deteksjonsgrenser på 6 pg/L for nortriptylin [33] når denne har blitt ekstrahert fra vandig prøve, ved bruk av væskefase mikroekstrasjon. I en studie av Zhang et. al. ble det rapportert om deteksjonsgrense på 0,02 mg/L (20 pg/mL) for petidin, ekstrahert fra urin ved bruk av LPME [34]. I disse studiene har det ikke blitt brukt DESI-MS til analysering av prøvene.

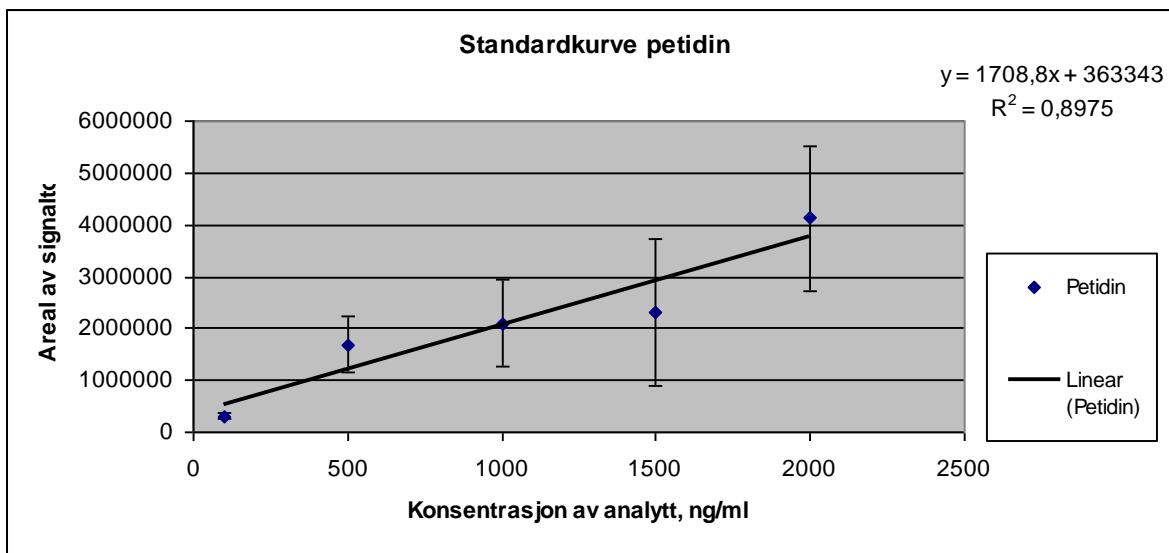
## 6.8 Standardkurver

Det ble lagd standardkurver for modellsubstansene petidin, diphenhydramin, metadon og nortriptylin. Kurvene ble lagd etter oppsett vist i Tabell 15. Det ble lagd tre fortynningsrekker, som alle ble lagd i en mix av morgenurin fra 3 personer. Denne mixen vil gi et bakgrunnssignal som er gjennomsnittet av bakgrunnssignalet av de tre urinprøvene. Haloperidol ble brukt som intern standard for alle analyttene, og denne ble tilsatt i konsentrasjon 2000 ng/mL.

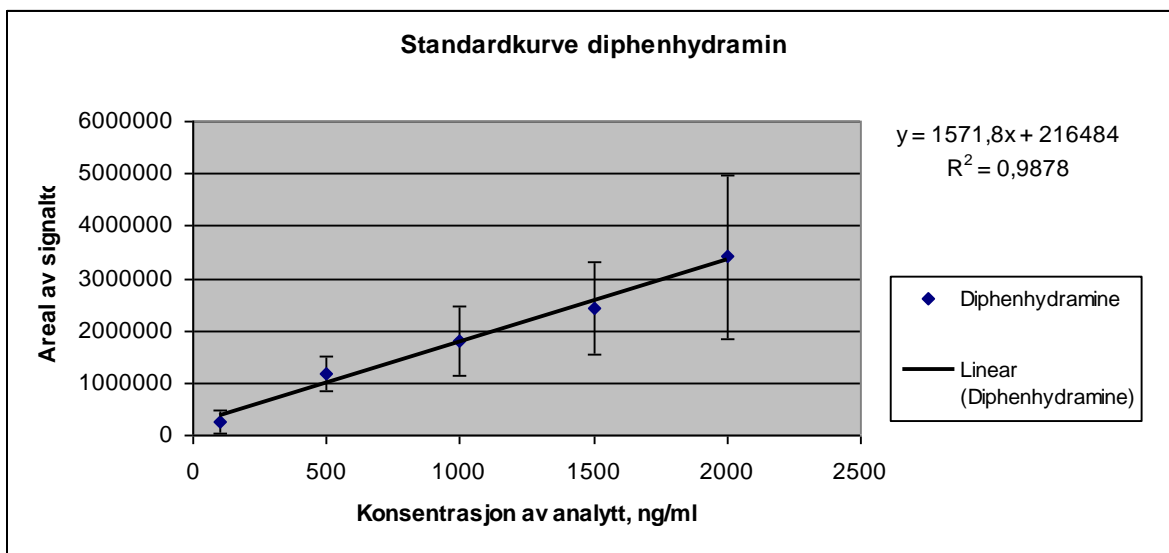
Konsentrasjon	0 ng/mL	100 ng/mL	500 ng/mL	1000 ng/mL	1500 ng/mL	2000 ng/mL
Antall paralleller i hver fortynningsrekke	1+1+1	2+2+2	1+1+1	2+2+2	1+1+1	2+2+2

Tabell 15; Oppsett for standardkurveforsøket.

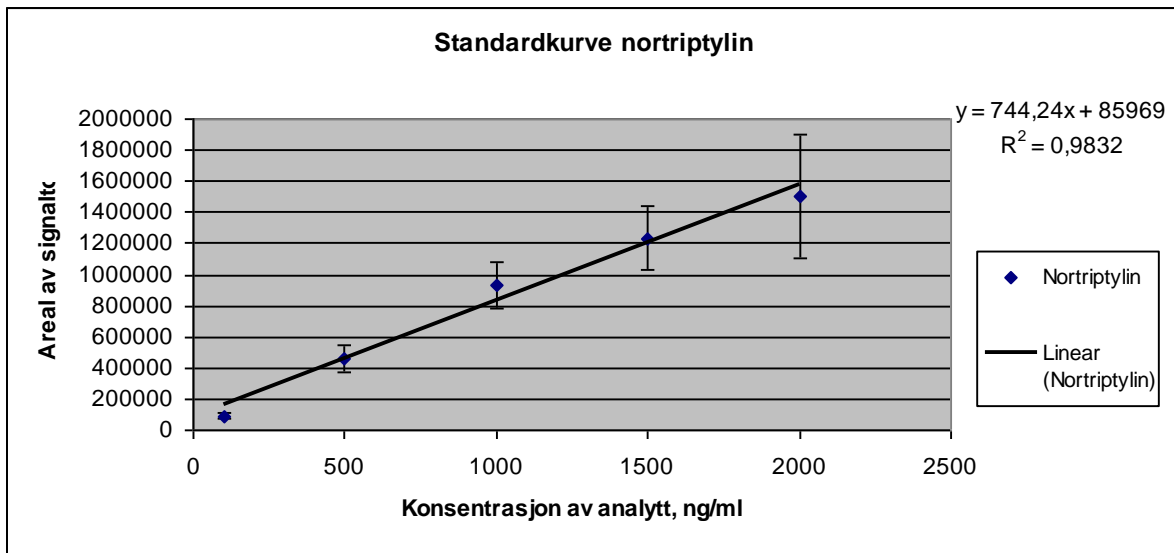
Det ble avsatt 4 flekker fra hvert ekstrakt, og flekkene ble analysert ved full scan-modus.



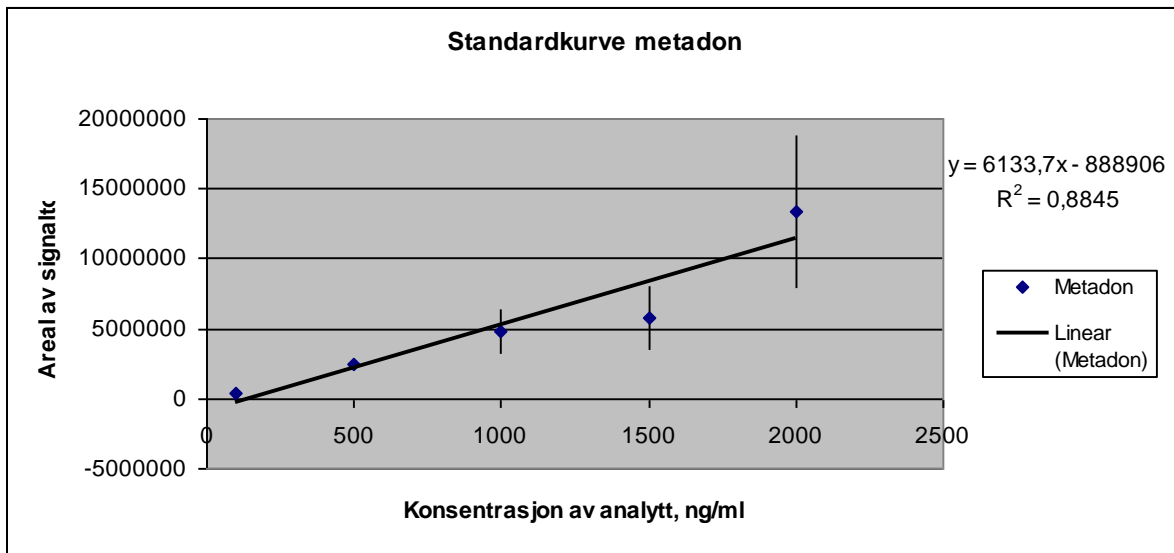
Figur 18; Standardkurve for petidin.



Figur 19; Standardkurve for diphenhydramin



Figur 20; Standardkurve for nortriptylin



Figur 18; Standardkurve for metadon.

Figurene viser at forholdet mellom konsentrasjon og respons på analyseapparatet fortsatt var lineært ved 2000 ng/mL for modellsubstansene diphenhydramin og nortriptylin. Haloperidol så ut til å fungere godt som intern standard for disse to.  $R^2$ -verdiene for petidin- og metadon-kurvene var lavere, det betyr at det enten var mindre linearitet i konsentrasjon/respons-forholdet for analytten eller i forholdet mellom analytt og intern standard (eller en kombinasjon av de to årsakene). Det kunne tenkes at det har skjedd en metning i ekstraksjonen ved høye konsentrasjoner, men da ville

kurven ha flatet ut mot de høyeste konsentrasjonene. Disse to kurvene stiger fra 1500 ng/mL til 2000 ng/mL, dette tyder på at det ikke skjedde en metning i ekstraksjonen. Årsaken til at det var mindre linearitet i disse kurvene er derfor trolig at haloperidol ikke var optimal som intern standard for petidin og metadon. For framtidige forsøk bør isotoper av modellsubstansene testes som interne standarder. Disse vil være de substansene som ligner modellsubstansene mest, og vil trolig gi de mest lineære kurvene. Dette er imidlertid ikke blitt forsøkt i denne oppgaven.

## 6.9 Ukjente prøver/Pålitelighetstest

Det ble samlet morgenurin fra 9 personer, og det ble lagd 46 prøver (nr 1-40 og 50-55) med ulike konsentrasjoner av ingen, ett eller flere av legemidlene metadon, petidin, nortriptylin og diphenhydramin. Mange av de spikede urinprøvene hadde legemiddelkonsentrasjoner rundt deteksjonsgrensene som ble bestemt i tidligere arbeid (kapittel 6.7), men noen prøver hadde høyere konsentrasjoner, og noen var blanke. Haloperidol ble tilsatt som intern standard i konsentrasjon 2 µg/mL. Urinprøvene ble ekstrahert ved hjelp av 3-fase LPME og analysert i både MS/MS-modus, for en kvalitativ bestemmelse, og i full scan, for å gi en kvantitativ bestemmelse.

På grunn av stort antall prøver, ble ikke alle prøvene analysert på samme dag. Det ble lagd nye kalibreringskurver for hver dag det ble gjort analyse på de ukjente prøvene, for å korrigere for dag-til-dag-variasjoner i analysen. Kalibreringskurvene ble lagd med de samme konsentrasjonene som standardkurvene (0-100-500-1000-1500-2000 ng/mL), og det ble ekstrahert 2 replikater på hvert konsentrasjonsnivå.

I Tabell 16 vises de virkelige konsentrasjonene av legemidler i de ukjente prøvene.

Prøve nr.	Urin nr.	Petidin	Diphenhydramin	Nortriptylin	Metadon
1	<b>1</b>	0	0	0	0
2 og 50	<b>2</b>	0	0	85	100
3	<b>1</b>	25	25	0	0
4	<b>3</b>	0	0	2200	10

## RESULTATER OG DISKUSJON

5	4	10	50	10	0
6	5	0	100	0	30
7	2	0	2000	0	5
8 og 51	6	550	470	500	500
9	7	0	100	0	0
10	7	4700	0	0	5000
11 og 52	8	0	0	0	0
12	2	0	0	0	0
13	9	0	0	200	12
14	5	27	0	25	0
15	4	0	0	0	10
16 og 53	1	75	10	13	0
17	1	2500	25	18	29
18	1	0	0	0	0
19	6	0	0	110	1200
20	9	35	100	25	10
21	4	50	0	0	0
22	3	0	0	7	0
23 og 54	8	22	310	230	5
24	2	100	50	500	0
25	9	0	520	0	20
26	2	350	150	3100	0
27	2	400	750	100	1000
28	5	0	250	0	70
29	3	0	0	0	0
30 og 55	8	0	52	23	9
31	8	1000	120	0	780
32	2	0	0	25	0
33	7	12	10	10	8
34	9	250	25	80	0
35	8	4000	4000	4100	3800
36	7	55	0	50	0
37	3	0	0	0	0
38	6	2700	0	25	15
39	1	0	55	0	0
40	8	0	150	0	210
5	2	0	0	85	100
51	6	550	470	500	500
52	8	0	0	0	0
53	1	75	10	13	0
54	8	22	310	230	5
55	8	0	52	23	9

*Tabell 16; Oversikt over de ukjente prøvene, og deres virkelige konsentrasjoner. Konsentrasjonene er oppgitt i ng/mL.*

Konsentrasjonene i de ukjente prøvene ble beregnet på grunnlag av tilhørende kalibreringskurve (se vedlegg og kapittel 6.8). Konsentrasjonene i prøve 1-4 og 8-13

## RESULTATER OG DISKUSJON

ble beregnet på grunnlag av standardkurvene i kapittel 6.8, da disse ble analysert samme dag som standardkurvene ble lagd.

Resultater for de ulike prøvene vises i Tabell 17.

Prøve nr.	Petidin	Diphenhydramin	Nortriptylin	Metadon
1	0	0	0	0
2 og 50	0	0	101	94
3	0	0	0	0
4	0	0	2554	0
5	14	33	0	0
6	0	204	0	29
7	0	2588	0	0
8 og 51	1399	595	512	639
9	0	0	0	0
10	7907	0	0	5637
11 og 52	0	0	0	0
12	2	0	0	0
13	0	0	177	0
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16 og 53	1	0	0	0
17	695	0	0	15
18	0	0	0	0
19	0	0	217	895
20	16	70	0	4
21	97	0	0	0
22	0	0	0	0
23 og 54	0	91	0	0
24	97	0	169	0
25	0	189	0	0
26	544	88	1058	0
27	529	546	0	796
28	0	131	0	34
29	0	0	0	0
30 og 55	0	0	0	0
31	1	0	0	3
32	0	0	0	0
33	1	0	0	0
34	243	0	33	0
35	511	585	804	1043
36	83	0	39	0
37	0	0	0	0
38	1653	0	42	2
39	0	0	0	0
40	0	54	0	69
5	0	0	30	94

## RESULTATER OG DISKUSJON

51	2225	441	460	858
52	0	0	0	0
53	nd	Nd	nd	nd
54	36	481	127	<b>0</b>
55	0	41	<b>0</b>	<b>0</b>

*Tabell 17; Konsentrasjoner (ng/mL) som ble bestemt i de ukjente prøvene, på grunnlag av kalibreringskurver.*

Det ble detektert én falsk positiv prøve, altså at beregningene viste at det var et legemiddel til stede i prøven, som i virkeligheten ikke var der. Dette gjaldt petidin i prøve nr.12. Beregningene viste at det var 2 ng/mL analytt tilstede i prøven. Da dette er under deteksjonsgrensen til petidin (25 ng/mL), ble det valgt å se bort fra dette tilfellet. Antallet falske negative resultater var 32, disse er markert med uthevet tall. De fleste av de falske negative prøvene hadde konsentrasjoner i området under eller like over deteksjonsgrensene. Ved å utelukke de falske negative resultatene som hadde konsentrasjoner under deteksjonsgrensene, reduseres antallet til 19.

Én årsak til at resultatene viser flere falske negative konsentrasjoner, kan være at det i arbeidet med å bestemme konsentrasjon i de ukjente prøvene, ble brukt fullscan-modus på MS-apparatet. Dette er en mindre følsom metode enn MS/MS, som ble brukt under arbeidet med å bestemme deteksjonsgrensene i kapittel 6.7. Dette tilsier at deteksjonsgrensene ved fullscan-modus vil være høyere enn ved MS/MS. Det vites ikke hvor stor forskjell det vil være i sensitivitet mellom fullscan og MS/MS-modus. Ved å øke deteksjonsgrensene i Tabell 14 med en faktor på 10, vil det kun stå igjen 2 falske negative resultater (Petidin og diphenhydramin i prøve nr. 31.) . Ettersom begge de falske negative kommer fra samme prøve, er det nærliggende å anta at noe uforutsett har gått galt i dette forsøket, det kan for eksempel tenkes at hulfiberen har vært lekk i den nedre enden og at akseptorfase dermed har blitt blandet med donorfase.

En annen årsak til at beregningene gir konsentrasjoner som ikke stemmer overens med de virkelige konsentrasjonene, er at standard- og kalibreringskurvene ikke er helt lineære. Regresjonslinjen vil være den linjen som passer best mulig med punktene, og ligningen for denne ble brukt til å beregne konsentrasjonene (ligningen ble løst med



hensyn på konsentrasjonen  $x$ ). I de tilfeller hvor regresjonslinjen har en lav  $R^2$ -verdi, vil ligningen gi et mindre nøyaktig resultat, enn i de tilfeller hvor regresjonslinjen har en høy  $R^2$ -verdi. Konsentrasjonene som blir beregnet blir mindre korrekte som følge av dette. Som nevnt tidligere, vil det å benytte deutererte substanser som interne standarder trolig føre til høyere kvalitet på resultatene. Dette kan forhåpentligvis gi kalibreringskurver som er mer lineære enn det som er tilfellet i denne oppgaven.

## 7. KONKLUSJON

I denne oppgaven har LPME for første gang blitt brukt i kombinasjon med DESI-MS. Både LPME og DESI-MS er relativt nye teknikker som det vil bli forsket mye mer på fremtiden. LPME ble, i samsvar med tidligere forskning, også i denne oppgaven vist å fungere godt også for modellsubstansene og generelt kan det påstås at LPME er en teknikk som er godt egnet i arbeidet med legemidler.

Det har vist seg at det er vanskelig å få gode, repeterbare resultater ved kombinasjon av LPME og DESI-MS. Med dagens DESI-utstyr og den manuelle styringen av hastigheten på DESI-kjøringen, er det vanskelig å få pålitelige kvantitative resultater. Dette kan forbedres ved å ta i bruk automatiserte styringssystemer som sikrer konstant scanhastighet over flekkene, og at de geometriske parametrene er like for alle flekkene som det scannes over. For å kunne bestemme lavere deteksjonsgrenser bør det brukes et mer følsomt MS-apparat.

Det kreves mer forskning for å forstå hvordan substanser oppfører seg under tørking av ekstraktdråper, og under DESI-deteksjonen. For å få bedre kvantitative resultater, bør det benyttes deuterert isotop av den enkelt substans som intern standard, i stedet for å benytte andre substanser til dette formålet. Dette vil kunne gi bedre resultater, for eksempel i forsøk med ukjente prøver. I dette arbeidet ble det ikke påvist falske positive resultater etter analyse av 46 prøver med ukjent konsentrasjon, men det ble påvist falske negative resultater. Ved å ta i bruk deutererte substanser som interne standarder, er det trolig at kalibreringskurvene vil bli mer lineære, og følgelig vil beregningene som blir utført for å bestemme konsentrasjon, gi resultater som samsvarer mer med de virkelige prøvekonsentrasjonene.

Konseptet med kombinasjon av LPME og DESI-MS vil i første omgang være lovende til bruk av screening av biologiske prøver. Dette vil være et nyttig verktøy blant annet i forbindelse med rusmiddelkontroll, der et stort antall prøver kan

screenes for kvalitative utslag på rusmidler på kort tid. De prøver med positive utslag kan deretter analyseres med andre analysemetoder for å få kvantitative resultater.

---

## 8. KILDELISTE

1. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 1 ed. 2004, Bergen: Fagbokforlaget. 503.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
3. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 132-142.
4. Liu, H. and P.K. Dasgupta, *Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(11): p. 1817-1821.
5. Ma, M.H. and F.F. Cantwell, *Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: Quantitative extraction*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(18): p. 3912-3919.
6. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Developments in Hollow Fibre Based Liquid-phase Microextractions*. Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**: p. 1-10.
7. Rasmussen, K.E., et al. *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*. 2000.
8. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs - Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data*. Journal of Separation Science, 2005. **28**(11): p. 1195-1203.
9. Pedersen-Bjergaard, S., T.S. Ho, and K.E. Rasmussen, *Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs*. Journal of Separation Science, 2002. **25**(3): p. 141-146.
10. Ugland, H.G., M. Krogh, and J.L.E. Reubsaet, *Three-phase liquid-phase microextraction of weakly basic drugs from whole blood*. Journal of Chromatography B, 2003. **798**(1): p. 127-135.
11. Zhu, L.Y., T. C.B., and H.K. Lee, *Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 231-237.
12. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis, 2000. **21**(3): p. 579-585.
13. Halvorsen, T.G., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B, 2001. **760**(2): p. 219-226.
14. Bjorhovde, A., et al., *Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk*. Analytica Chimica Acta, 2003. **491**(2): p. 155-161.

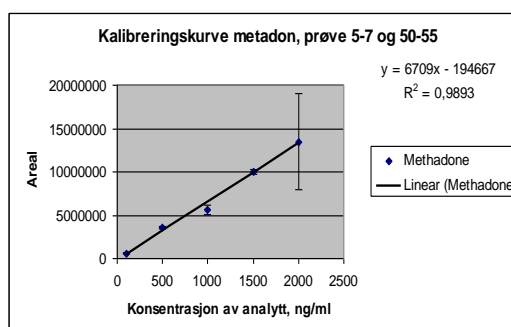
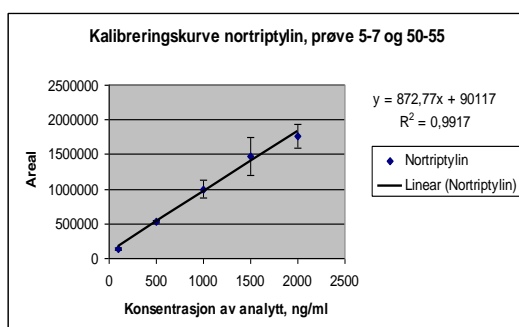
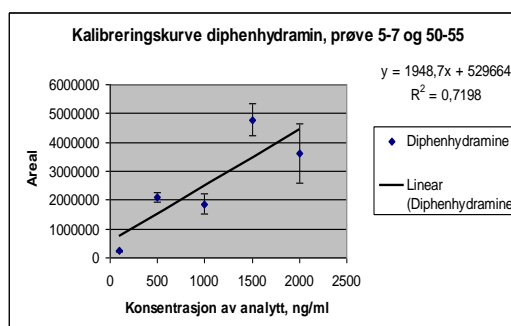
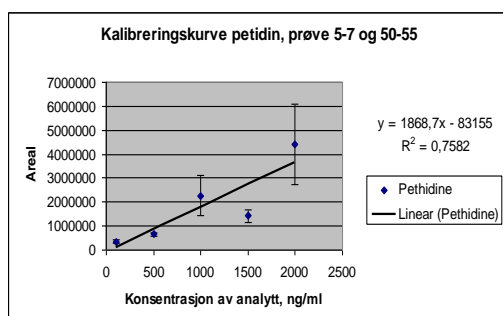
15. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2005. **817**(1): p. 3-12.
16. Takats, Z., et al., *Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization*. Science, 2004. **306**(5695): p. 471-473.
17. Ifa, D.R., et al., *Quantitative analysis of small molecules by desorption electrospray ionization mass spectrometry from polytetrafluoroethylene surfaces*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(4): p. 503-510.
18. Garcia-Reyes, J.F., et al., *Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry for Trace Analysis of Agrochemicals in Food*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(2): p. 820-829.
19. Cooks, R.G., et al., *Ambient Mass Spectrometry*. Science, 2006. **311**(5767): p. 1566-1570.
20. Kauppila, T.J., et al., *Desorption electrospray ionization mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals and metabolites*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(3): p. 387-392.
21. D'Agostino, P.A., et al., *Desorption electrospray ionisation mass spectrometric analysis of chemical warfare agents from solid-phase microextraction fibres*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007. **21**(4): p. 543-549.
22. Kauppila, T.J., et al., *Rapid analysis of metabolites and drugs of abuse from urine samples by desorption electrospray ionization-mass spectrometry*. Analyst, 2007. **132**(9): p. 868-875.
23. Lin, Z., et al., *Rapid screening of clenbuterol in urine samples by desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(12): p. 1882-1888.
24. Dénes, J., et al., *Analysis of Biological Fluids by Direct Combination of Solid Phase Extraction and Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(4): p. 1669-1675.
25. Green, F.M., et al., *Developing Repeatable Measurements for Reliable Analysis of Molecules at Surfaces Using Desorption Electrospray Ionization*. Analytical Chemistry, 2009. **81**(6): p. 2286-2293.
26. Takats, Z., J.M. Wiseman, and R.G. Cooks, *Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology*. Journal of Mass Spectrometry, 2005. **40**(10): p. 1261-1275.
27. Uglund, H.G., M. Krogh, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices*. Journal of Chromatography B, 2000. **749**(1): p. 85-92.

- 
28. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 1-10.
  29. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Developments in liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(10): p. 565-574.
  30. Venter, A., M. Nefliu, and R.G. Cooks, *Ambient desorption ionization mass spectrometry*. Trends in Analytical Chemistry, 2008. **27**(4): p. 284-290.
  31. Crotti, S. and P. Traldi, *Aspect of the Role of Surfaces in Ionization Processes*. Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening, 2009. **12**(2): p. 125-136.
  32. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. Journal of Chromatographic A, 2007. **1157**(1-2): p. 38-45.
  33. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. Analytica Chimica Acta, 2007. **592**(1): p. 1-8.
  34. Zhang, Z., et al., *Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine*. Analytica Chimica Acta, 2008. **621**(2): p. 185-192.

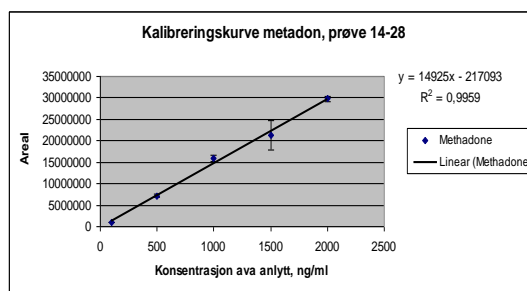
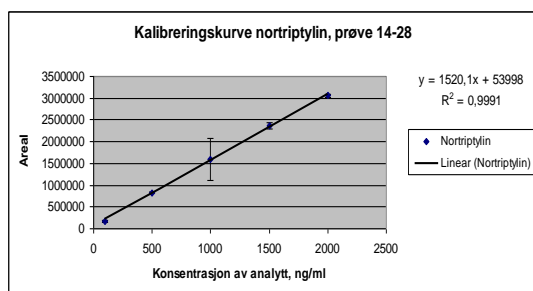
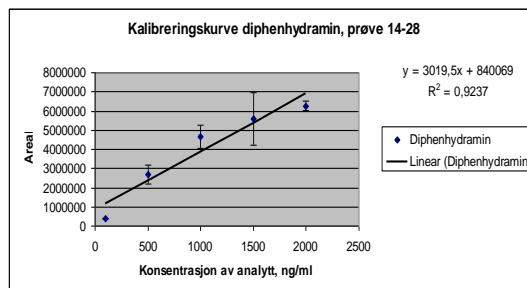
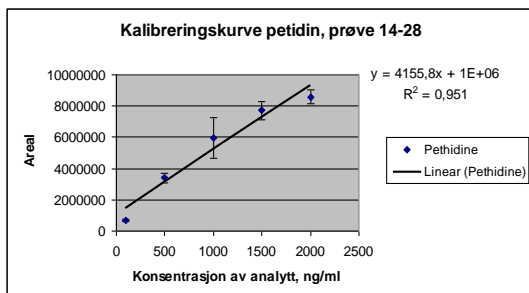
## 9. VEDLEGG

### 9.1 Kalibreringskurver

#### 9.1.1 Kalibreringskurver prøve 5-7 og prøve 50-55



## 9.1.2 Kalibreringskurver prøve 14-28





### 9.1.3 Kalibreringskurver prøve 29-40

