

Kosttilskudd og doping

*Metabolisme av synefrin og oktopamin og
utskillelse i urin etter inntak av tilsvarende
kosttilskuddsprodukter hhv. et spesielt
matinntak*

Linda Sørvang Stensrud



Masteroppgave i legemiddelanalyse

Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet,

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2010

Mastergradsoppgave i legemiddelkjemi

Fagområde: Legemiddelanalyse

Kosttilskudd og doping

Metabolisme av synefrin og oktopamin og utskillelse i urin etter inntak av tilsvarende kosttilskuddsprodukter hhv. et spesielt matinntak

Linda Sørvang Stensrud

Veiledere:

Prof. Dr. Peter Hemmersbach

Farmasøytisk institutt/Norges laboratorium for dopinganalyse,

Oslo universitetssykehus, Aker

Siv. Ing. John Henninge

Norges laboratorium for dopinganalyse

Oslo universitetssykehus, Aker

Oppgaven ble utført ved:

Norges laboratorium for dopinganalyse

Oslo universitetssykehus, Aker

© Linda Sørvang Stensrud

2010

Metabolisme av synefrin og oktopamin og utskillelse i urin etter inntak av tilsvarende kosttilskuddsprodukter hhv. et spesielt matinntak

Linda Sørvang Stensrud

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Representeren, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Etter at efedrin ble forbudt som tilsetningsstoff i kosttilskuddsprodukter på grunn av faren for uheldige bivirkninger, har det de senere årene dukket opp flere produkter med innhold av synefrin. Synefrin er et stimulerende stoff med lignende struktur som efedrin, men den sentralstimulerende effekten er mindre. En vanlig kilde til synefrin, som blir brukt som tilsetningsstoff i kosttilskuddspreparater og næringsmidler, er *Citrus aurantium* (bitterappelsin). Et annet stimulerende stoff med lignende struktur som efedrin, er oktopamin. Stoffet har i den senere tid fått økt oppmerksomhet for sin påståtte fettforbrennende effekt, og flere preparater som inneholder oktopamin er tilgjengelige på kosttilskuddsmarkedet.

Både synefrin og oktopamin er nevnt i WADAs 2010 Prohibited List. Oktopamin er i henhold listen forbudt substans brukt i konkurranse. Synefrin er ikke forbudt brukt i konkurranse, men er gjenstand for observasjon i et Monitoring Program.

Bakgrunn for oppgaven var et ønske om å utvikle en spesifikk analysemetode for kvantifisering av synefrin og oktopamin i urinprøver. Det var også ønskelig å få et bilde av utskillelsesprofilen til synefrin og oktopamin i urin etter inntak av kosttilskuddspreparater og næringsmidler.

Et utskillelsesforsøk som inkluderte et kosttilskuddspreparat med innhold av synefrin, et kosttilskuddspreparat med innhold av oktopamin og et næringsmiddel med innhold av synefrin ble utført. Hver forsøksperson fikk administrert de to preparatene og det ene næringsmidlet på separate tidspunkter. Urin ble samlet i 24 timer etter inntak, og en spotprøve ble avlagt etter 48 og 72 timer.

Preparatene som ble valgt var Synephrine "Top Formula" med oppgitt innhold av *Citrus aurantium* tilsvarende 100 mg synefrin, og Beta 3 Metabolic Optimizer "Syntrax" oppgitt å inneholde 500 mg oktopamin. Næringsmiddelet med innhold av synefrin var en kommersielt tilgjengelig appelsinmarmelade laget av bitterappelsiner (*Citrus aurantium*).

Opgaven ble utført ved Norges laboratorium for dopinganalyse, Oslo Universitetssykehus, avdeling Aker. Forsøkspersonene ble rekruttert blant ansatte ved laboratoriet. Totalt 3 forsøkspersoner deltok i studien.

En analysemetode for synefrin og oktopamin ble utviklet og validert i henhold internasjonale standarder og kriterier satt ved Norges laboratorium for dopinganalyse. Fast-fase-ekstraksjon ble benyttet til opprensing av prøvene, og prøvene ble analysert ved bruk av GC/MS. Konsentrasjon korrigert for spesifikk vekt ble beregnet for prøvene, og gjennomsnittlig utskillelseshastighet ble også beregnet.

Resultatene viste store variasjoner i utskilt mengde synefrin mellom forsøkspersonene. For oktopamin var den observerte variasjonen mindre. Konsentrasjonen av synefrin og oktopamin i urin etter inntak av kosttilskudd og næringsmiddel var høyest de første timene etter inntak, og innen 24 timer etter inntak var urinkonsentrasjonene tilbake til utgangspunktet.

Muligheten for å sette grenseverdier for synefrin og oktopamin i urin etter inntak av henholdsvis kosttilskuddspreparater og næringsmidler ble vurdert. Et foreløpig forslag til grenseverdi i urin for oktopamin ble satt til 5 µg/ml, og et forslag til en grenseverdi for konsentrasjon av synefrin i urin ble satt til 50 µg/ml. Konsentrasjoner av synefrin og oktopamin over grenseverdien i urinprøver vil være en indikasjon på inntak av kosttilskuddspreparater med høyt innhold av synefrin og oktopamin.

På grunn av tidsbegrensing ble antallet forsøkspersoner i studien begrenset. For å kunne fastsette grenseverdier må det gjøres studier som inkluderer et større antall forsøkspersoner.

Forord

Jeg vil rette en stor takk til alle ansatte ved Norges laboratorium for dopinganalyse. Tusen takk for den gode mottagelsen, for all hjelp jeg har fått på laben, og for alle de sosiale lunsjene og kaffemøtene som til sammen har gjort dette til et flott og lærerikt år!

Særlig vil jeg takke veilederne mine, John Henninge og Peter Hemmersbach, for god veiledning gjennom året, og for at å ha delt deres ekspertise og kunnskap med meg. En spesielt stor takk til John som stilte opp når jeg trengte det som mest for å komme i havn!

Jeg vil også takke min kontorvenn Carlos, og min studiekamerat Stian, for alle faglige og mindre faglige utvekslinger underveis.

Takk til forsøkspersonene som bidro med urin.

Sist, men ikke minst, vil jeg takke familien min for støtte underveis gjennom mange år med skolegang, og spesielt min samboer Espen for all støtte og oppmuntring i innspurten. Endelig ferdig!

Oslo, mai 2010

Linda Sørvang Stensrud

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	12
1.1	Doping generelt	12
1.2	Stimulerende midler	14
1.2.1	Virkningsmekanisme og bruk	14
1.2.2	Oktopamin.....	16
1.2.3	Synefrin	19
1.3	Analyse av stimulerende stoffer	21
1.3.1	Intern standard.....	22
1.3.2	Hydrolyse	23
1.3.3	Fast-fase ekstraksjon	24
1.3.4	Væske-væske-ekstraksjon	25
1.3.5	Derivatisering	26
1.3.6	Gasskromatografi	27
1.3.7	Massespektrometri	27
1.3.8	Identifikasjon og kvantifisering	31
1.4	Problemstilling.....	32
2	Eksperimentelt.....	33
2.1	Forsøkspersoner.....	33
2.2	Organisering av forsøk	34
2.2.1	Forforsøk	34
2.2.2	Hovedforsøk	36
2.3	Kjemikalier og utstyr	36
2.4	Løsninger	38
2.4.1	Bruksløsninger til prøveopparbeidelse	38
2.4.2	Internstandarder.....	39
2.4.3	Kalibratorløsninger.....	40
2.4.4	Standardkurve til kvantifisering.....	40
2.5	Metodeutvikling.....	41
2.5.1	Forarbeid/forforsøk	41
2.5.2	Prøveopparbeidelse	41
2.5.3	Valg av internstandard	45

2.5.4	Området for kalibreringskurven	45
2.6	Analyseparametre	46
2.6.1	Instrument: GC-MS	46
2.7	Identifikasjon og kvantifisering	47
2.8	Prosedyre for validering	49
2.8.1	Selektivitet/spesifisitet	49
2.8.2	Linearitet	49
2.8.3	Presisjon og nøyaktighet	50
2.8.4	Gjenvinning (recovery)	51
2.8.5	LOD og LOQ	51
3	Resultater.....	52
3.1	Forforsøk	52
3.2	GC-MS-metoden	58
3.3	Validering	58
3.3.1	Linearitet	59
3.3.2	Presisjon og nøyaktighet	59
3.3.3	Gjenvinning (recovery)	60
3.3.4	LOD og LOQ	61
3.4	Hovedforsøket	61
3.4.1	Fremstilling av resultatene fra prøvene	62
3.4.2	Synefrin	62
3.4.3	Oktopamin.....	65
3.4.4	Appelsinmarmelade.....	69
4	Diskusjon.....	73
4.1	Forforsøk	73
4.2	Valideringen	75
4.3	Forsøket	77
4.3.1	Prøvene.....	77
5	Konklusjon	81
	Referanser.....	83

Forkortelser

$C_{\text{korrigeret}}$	Konsentrasjon korrigeret for spesifikk vekt
$C_{\text{ukorrigeret}}$	Konsentrasjon ikke korrigeret for spesifikk vekt
CNS	Sentralnervesystemet
CV	Relativt standardavvik
EI	Elektronionisasjon
EPO	Erytropoietin
FIFA	Det internasjonale fotballforbundet
GI	Gastrointestinaltraktus
GC	Gasskromatografi
HC	Høy konsentrasjon
HCl	Saltsyre
IAAF	internasjonale friidrettsforbundet
IOC	International Olympic Comitee
LC	Lav konsentrasjon
LLE	Væske-væske-ekstraksjon
LOD	Limit of detection (deteksjonsgrense)
LOQ	Limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
<i>m-</i>	Meta-
M	Molar (mol/l)
M^+	Molekylion
MAO	Monoaminoksidase
MC	Middels konsentrasjon

mg	Milligram
ml	Milliliter
MS	Massespektrometri
MSTFA	N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid
<i>m/z</i>	Masse/ladning
ng	Nanogram
<i>p</i> -	Para-
REK	Regional etisk komité
SIM	Selective ion monitoring
SPE	Fast-fase-ekstraksjon
TAAR	Trace amine-associated receptor (sporaminassosiert reseptor)
TBME	<i>tert</i> -butylmetyleter
TIC	Total ion current (totalt ionestrømskromatogram)
TMSCl	trimetylsilylchlorid
UCI	Det internasjonale sykkelforbundet
WADA	World Anti-Doping Agency
µg	mikrogram
µl	mikroliter

1 Innledning

1.1 Doping generelt

Doping er et fenomen som antagelig har eksistert like lenge som det har blitt bedrevet konkurransedrett. Målet har alltid vært å få en konkurransefordel, selv om metodene har vært forskjellige opp gjennom tidene. Man vet at allerede for 5000 år siden i Kina brukte idrettsutøvere et planteekstrakt fra planten Ma Huang (senere kjent som *Ephedra sinica*) for å styrke hjertefunksjonen. Planteekstraktet har i senere tid vist seg å inneholde efedrin. Her hjemme hevdes det at berserkene benyttet fluesopp for å forberede seg til strid. Ordet ”dop” har utspring i en afrikansk plantedrikk som skulle gi krigere styrke og utholdenhet. Begrepet ble videre tatt i bruk i Europa på slutten av 1800-tallet, først i litt motsatt betydning innen hesteveddeløp der ryttere manipulerte motstandernes hester slik at de presterte dårligere, noe som også ble omtalt som ”anti-doping” (1). Begrepet ”dop” ble senere utvidet til å omfatte stimulerende drikker og prestasjonsfremmende metoder, mens ”antidoping” i dag som kjent blir brukt til å betegne arbeidet som blir gjort for å bekjempe alle former for doping innen idretten. (1, 2)

Allerede da konkurransedrett for fullt slo gjennom som folkeunderholdning i Europa på midten av 1800-tallet ble bruken av stimulerende midler for å øke prestasjonsevnene omdiskutert. Alkohol, stryknin, koffein og kokain var stoffer som ofte ble benyttet. På begynnelsen av 1900-tallet og frem mot andre verdenskrig økte bruken av stimulerende midler. Amfetamin, et syntetisk stimulerende middel, ble første gang syntetisert på slutten av 1800-tallet. Bruken av stoffet eskalerte under andre verdenskrig da det ble gitt til soldatene for å dempe tretthet og øke årvåkenheten. Videre spredte bruken seg over i det sivile, både til rekreasjonsbruk og i idrettssammenheng.(1-3)

Testosteron ble isolert og syntetisert rundt 1930-tallet, og ble også benyttet under andre verdenskrig for å øke soldatenes aggressivitet. Allerede på 1950-tallet begynte bruken av testosteron i idrett blant russiske vektløftere. I årene som fulgte ble stadig nye steroider utviklet, og de ble mer og mer vanlige også utenfor idretten, spesielt innenfor kroppsbyggermiljøet (2).

På 1970-tallet gikk det rykter om at idrettsutøvere hadde tatt i bruk en ny form for doping, nemlig bloddoping. Bloddoping innebærer blant annet overføring av autologt (eget) eller ikke-autologt blod, eller bruk av EPO (erythropoietin). Målet med bloddoping er å øke blodets transportkapasitet av oksygen, og dermed forbedre utholdenheten. Mye tyder på at bruken har vært økende de siste tiårene, men det har lenge vært et problem å påvise bruk av bloddoping. I de senere årene har man imidlertid klart å utvikle pålitelige påvisningsmetoder for EPO som har blitt tatt i bruk innen dopinganalyse.(3, 4)

Nye dopingmetoder er under konstant utvikling, og nye dopingmidler dukker derfor stadig opp. I de aller fleste tilfeller er dopingmidlene et resultat av fremskritt innen medisinsk og farmakologisk utvikling. De fleste dopingmidler er først utviklet som legemidler med tanke på å behandle sykdommer og medisinske tilstander, men stoffene innehar også et misbrukspotensiale når de kan forsterke og forbedre fysiologiske funksjoner hos friske mennesker. (1, 2) Et av de nyere feltene innen doping er bruk av veksthormon. Veksthormon har lenge vært brukt innen medisin til behandling av vekstforstyrrelser, der man blant annet oppnår økt muskelmasse og økt muskelstyrke. Av de samme grunnene er veksthormon aktuelt som et dopingmiddel, og sett i sammenheng med blant annet økt tilgjengelighet på det illegale markedet, er dette et område der det arbeides med å utvikle pålitelige påvisningsmetoder. (3)

Så lenge doping har vært kjent innen idretten har det også pågått en løpende diskusjon hvorvidt dette skal være tillatt eller ikke. Ulike forbud og tilhørende sanksjoner har eksistert opp gjennom tidene. I 1928 ble det internasjonale friidrettsforbundet (IAAF) det første internasjonale forbund som begrenset doping ved å forby bruk av stimulerende midler, men siden det ikke var mulig å teste utøverne i praksis var tiltaket lite effektivt. Flere tragiske dødsfall under store internasjonale konkurranser gjorde behovet for restriksjoner og dopingtesting åpenlyst. I 1966 ble det internasjonale sykkelforbundet (UCI) og det internasjonale fotballforbundet (FIFA) de første forbundene som innførte dopingtesting, og i 1967 hadde den Internasjonale olympiske komité (IOC) satt ned en Medisinsk kommisjon som utarbeidet den første listen over forbudte stoffer. Under de olympiske leker i Grenoble og Mexico i 1968 ble de første dopingtestene utført. I det videre anti-dopingarbeidet ble det mer og mer tydelig at man trengte et uavhengig internasjonalt organ som kunne samle, overvåke og fremme anti-dopingarbeidet. Etter en konferanse i regi av IOC ble World Anti-Doping Agency (WADA) stiftet i november 1999 for å ta seg av dette arbeidet. (1, 2, 4)

WADA er et samarbeid mellom den Internasjonale Olympiske komité, nasjonale myndigheter, og nasjonale og internasjonale særforbund. WADA utvikler World Anti-Doping Code, som følges opp av nasjonale antidopingbyråer. I Norge er det Stiftelsen Antidoping Norge som har hovedansvaret for anti-dopingarbeidet, derunder kontroller og påtalevirksomhet. Prøver tatt av idrettsutøvere blir kun analysert ved spesielle laboratorier som er akkreditert av WADA. Akkrediteringen er et bevis på at laboratoriet oppfyller bestemte krav satt av WADA, og kravene er blant annet utviklet i henhold til internasjonale laboratoriestandarder. Laboratoriet sin rolle er å være en uavhengig part som kun utfører selve analysene. Norge fikk sitt første akkrediterte laboratorium for dopinganalyse i 1988, som da var en seksjon ved Hormonlaboratoriet på Aker sykehus. Laboratoriet har blitt re-akkreditert hvert år siden 1988, og Norges laboratorium for dopinganalyse er i dag en egen seksjon under Oslo Universitetssykehus. (1, 2, 4, 5)

1.2 Stimulerende midler

1.2.1 Virkningsmekanisme og bruk

Dopingmidler kan grovt sett deles i to grupper: Kroppsegne og kroppsfremmede. De kroppsegne er stoffer som naturlig finnes i kroppen, men som oftest i lavere konsentrasjoner enn når de blir brukt som dopingmidler. De kroppsfremmede stoffene er syntetiske stoffer som ikke naturlig vil kunne finnes i kroppen, og funn av slike stoffer i dopingprøver vil være et direkte bevis for inntak av stoffet. WADA utarbeider hvert år en liste over stoffer som er forbudt å bruke innen idrettssammenheng, kalt Prohibited List. Stimulerende midler er definert som en egen klasse substanser, S6, og disse er kun forbudt brukt under konkurranse. Grunnen til dette er at effekten av disse stoffene er relativt kortvarig, og gevinsten ved bruk av disse stoffene utenom under konkurranse er svært liten. (6)

Oktopamin står på forbudslista. Synefrin er også omtalt, men da som en del av et Monitoring Program. Det betyr at stoffet ikke er forbudt brukt i konkurranse, men at det likevel er av interesse å følge med på bruken av stoffet. (7)

Det kan være forskjellige grunner til at idrettsutøvere inntar stimulerende midler. Stimulerende midler kan være tatt med hensikt for å forbedre prestasjonsevnene eller de kan

være inntatt for rekreasjonsbruk, men da som oftest ikke med den hensikt å forbedre prestasjonsevnen i idrettssammenheng. I mange land er enkelte stimulerende midler ofte tilsatt i næringsmidler og kosttilskudd, samt utbredt i reseptfrie legemidler, slik at en idrettsutøver kan ha inntatt stimulerende midler uten å være klar over det selv.

Innenfor dopingsammenheng er stimulerende midler definert som stoffer som påvirker sentralnervesystemet (CNS) på en slik måte at stemningsleie, årvåkenhet, bevegelsevne og appetitt endres, eller stoffer som virker på det sympatiske nervesystemet slik at man blant annet kan få økt kardiovaskulær aktivitet. (6)

Synefrin og oktopamin er to stimulerende stoffer som har sin effekt i den sympatiske delen av det perifere nervesystemet. I det sympatiske nervesystemet er noradrenalin den viktigste neurotransmitteren. Postganglioniske fibre frigir noradrenalin som kan virke på enten α - eller β -adrenerge reseptorer. α -Reseptorer er lokalisert blant annet i blodårer, gastrointestinaltrakten (GI), øyet, huden, spyttkjertler og i leveren. β -Reseptorer er lokalisert blant annet i hjertet, blodårer, bronkier, gastrointestinaltrakten, øyet, spyttkjertler, nyrer og lever. Blant α -reseptorene er det to subtyper, og blant β -reseptorene er det tre subtyper som medierer forskjellige responser ved aktivering:

- α_1 : vasokonstriksjon, avslapping av glatt muskulatur i GI, spyttsekresjon og glykogenolyse i leveren
- α_2 : hemmet transmitterfrigjøring i blant annet det autonome nervesystemet, aggregering av blodplater, kontraksjon av glatt muskulatur i blodårer og hemmet insulinfrigjøring
- β_1 : økt hjertefrekvens og slagkraft i hjertet
- β_2 : utvidelse av bronkier, utvidelse av blodårer, glykogenolyse i lever og muskelskjelvinger
- β_3 : lipolyse

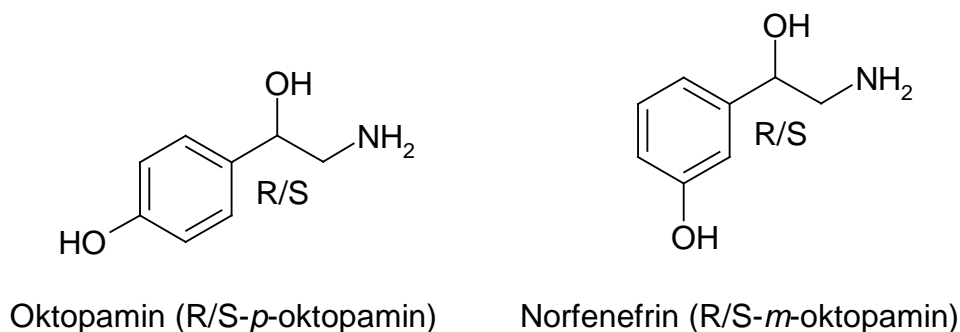
Stimulerende midler kan utøve sin effekt via flere forskjellige virkningsmekanismer. De kan hemme re-opptak av neurotransmittere, stimulere frigjøring av neurotransmittere, hemme enzymer som bryter ned neurotransmittere (for eksempel monoamin oksidase, MAO) eller stimulere reseptorer (agonister). (6, 8)

1.2.2 Oktopamin

Oktopamin er et amin som lenge har vært kjent som et farmasøytisk produkt til behandling av hypotensjon. (9, 10) Stoffet ble først karakterisert som naturlig forekommende i ekstrakter fra spyttkjertel hos blekksprut, og derav kommer også navnet (11). Oktopamin ble senere identifisert i urin både fra mennesker og dyr (9, 12), og også i plantemateriale (13).

Oktopamin er et primært amin, og molekylet kan foreligge på seks forskjellige isomere former. Benzenringen kan være enten para-, meta- eller ortho-substituert, og molekylet har i tillegg et stereokjemisk senter slik at man enten kan ha R-isomeren eller S-isomeren av molekylet. De isomere formene som er aktuelle for denne oppgaven er vist i figur 1.1.

I denne oppgaven refererer navnet oktopamin til den para-substituerte formen, mens den meta-substituerte formen omtales som norfenefrin. Norfenefrin har i likhet med oktopamin blitt brukt til behandling av hypotensjon i noen europeiske land. (14)



Figur 1.1 Isomere former av oktopamin

Oktopamin har i hovedsak en agonisteffekt på α -adrenerge reseptorer som blant annet fører til karkontraksjon og blodtrykksøkning. Oktopamin er også rapportert å ha virkning på β -reseptorer. Stoffet har i den senere tid fått ny oppmerksomhet for sin antatte stimulerende effekt på β_3 -reseptorer, som kan føre til økt fettforbrenning, selv om oktopamins evne til selektivt å stimulere β_3 -reseptorer i humane fettceller har vist seg å være liten. (6, 15) Studier indikerer også at *m*-oktopamin generelt er mer aktiv enn *p*-oktopamin. (16)

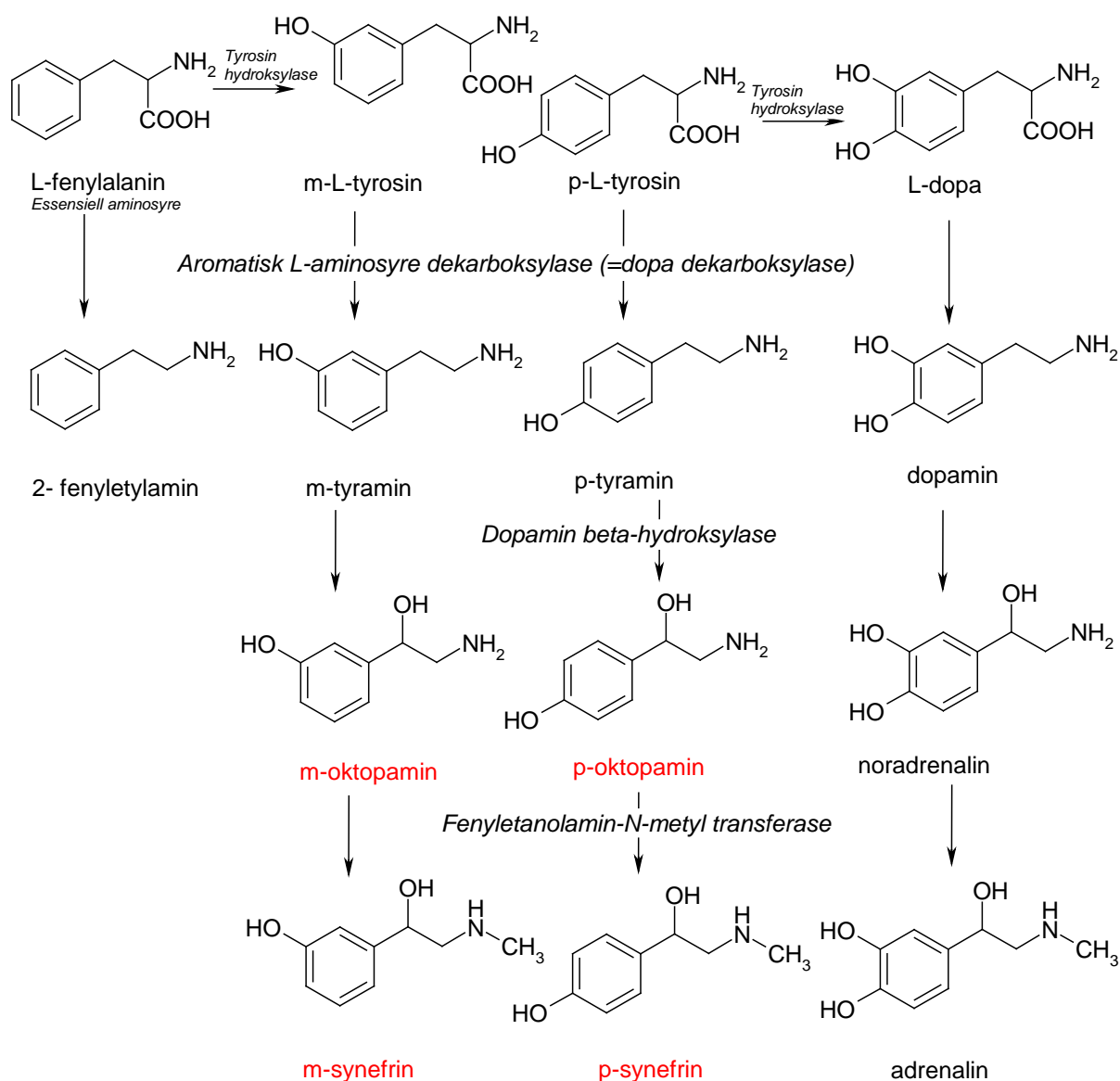
Siden 1950-tallet da oktopamin først ble oppdaget, førte utviklingen av mer spesifikke og sensitive analysemetoder til at man fant både *p*- og *m*- oktopamin i humant vev og i urin. (17) Forskning har vist at oktopamin er et endogent sporamin som finnes i lave konsentrasjoner

hos mennesker sammen med tyramin, tryptamin og β -fenyletylamin. Oktopamin har lenge vært kjent som en neurotransmitter i virvelløse dyr, og mye tyder på at stoffet er en neurotransmitter eller neuromodulator også i sentralnervesystemet hos mennesker, selv om virkningsmekanismen(e) fremdeles ikke er fullstendig klarlagt. Nylig har det blitt oppdaget en ny familie med G-protein-koblede reseptorer som har sporaminer som ligander, kalt sporamin-assosierte reseptorer (trace amine-associated receptors, TAARs). Mye forskning foregår nå for å kartlegge betydningen av disse reseptorene, og hvilken rolle sporaminene har i kroppens signalsystemer i forhold til de kjente neurotransmitterene. (18-20)

I tillegg til at sporaminene naturlig finnes i kroppen, forekommer de også i enkelte næringsmidler. Spesielt kan ulike fermenterte matvarer være rike på sporaminer og andre biogene aminer. Tyramin finnes i blant annet ost, soyasaus og fermentert fiskesaus. (21, 22) Også innholdet av oktopamin har vært undersøkt i forskjellige fermenterte matvarer, og oktopamin er blant annet påvist i risvin (23), fermentert kål (sauerkraut) og fermentert fiskesaus (21). Oktopamin er også påvist i ulike typer sitrusfrukter, deriblant *Citrus aurantium*. (13, 16)

Biosyntese og metabolisme

Både *p*- og *m*- oktopamin blir syntetisert i sentralnervesystemet via de samme synteseveiene som noradrenalin og adrenalin. Utgangspunktet for syntesen er aminosyren L-fenylalanin, og via enzymene tyrosin hydroksylase, aromatisk L-aminosyre dekarboksylase og dopamin β -hydroksylase dannes oktopamin.(24, 25) Biosyntesen er vist skjematisk i figur 1.2.



Figur 1.2 Biosyntese av oktopamin og synefrin.

Metabolisme av oktopamin skjer i hovedsak via enzymet monoaminoksidase (MAO).

Deaminering av *p*- og *m*- oktopamin via MAO gir metabolittene *p*- og *m*-hydroksymandelsyre.(10, 24)

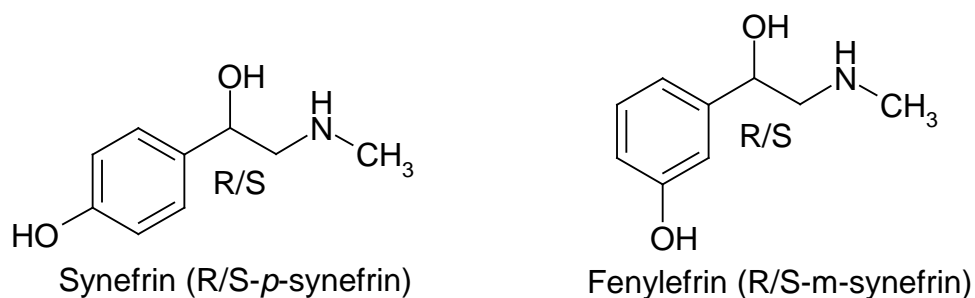
I en studie som undersøkte absorpsjon, metabolisme og eliminasjon av *p*-oktopamin etter enten infusjon eller oralt inntak, fant man at henholdsvis 82 % og 93 % av total inntatt mengde ble skilt ut i urin innen 24 timer etter inntak. Maksimal plasmakonsentrasjon ble observert etter 2 timer ved infusjon og etter mellom 30 og 60 minutter ved oralt inntak, noe

som indikerer raskt opptak av oktopamin i kroppen. 67 % av inntatt mengde oktopamin ble skilt ut som metabolitten *p*-hydroksymandelsyre, rundt 20 % ble skilt ut som konjugert oktopamin, og under 10 % ble skilt ut som fritt oktopamin. Konjugatene er i hovedsak glukuronider og sulfater. (10)

1.2.3 Synefrin

Syntetisk synefrin ble første gang rapportert i 1927. (26) Stoffet ble oppdaget i urin fra mennesker rundt 1960 under utvikling av en analysemetode for metanefriner, og ble senere identifisert som *p*-synefrin. (27) Synefrin ble også identifisert i plantemateriale fra ulike sitrusarter. (26) Synefrin har blitt brukt som et middel mot hypotensjon, og som et karkontraherende middel i øyedråper. (14)

Synefrin er et sekundært amin, og kan i likhet med oktopamin foreligge på seks forskjellige isomere former. Benzenringen kan være enten para-, meta- eller ortho-substituert, og molekylet har et stereokjemisk senter slik at man enten kan ha R-isomeren eller S-isomeren av molekylet. De isomere formene som er aktuelle for denne oppgaven er vist i figur 1.3. I denne oppgaven refererer navnet synefrin til den para-substituerte formen, mens den meta-substituerte formen omtales som fenylefrin. I likhet med synefrin er fenylefrin brukt til behandling av hypotensjon. Fenylefrin er også mye brukt som et slimhinneavsvellende middel i ulike preparater mot forkjølelse, selv om effekten har vært omdiskutert. Fenylefrin finnes også i øyedråper i forskjellige konsentrasjoner som et karkontraherende middel, og som et middel for å utvide pupillen. (14)



Figur 1.3 Isomere former av synefrin.

Synefrin har i hovedsak effekt på α -adrenerge reseptorer. Perifer aktivering av α_1 -reseptorer fører til karkontraksjon og økning i blodtrykk. Synefrin har også effekt på β -reseptorer. (16, 28) Studier har vist at synefrin kan ha en svak lipolytisk effekt, men denne effekten ble ikke vist å være mediert av selektiv β_3 -reseptorstimulering. (15) Som i likhet med oktopamin indikerer studier at *m*-synefrin generelt er mer aktiv enn *p*-synefrin. (16)

Synefrin er et sporamin som blir syntetisert i små mengder i sentralnervesystemet. Sporaminene finnes også i det perifere nervesystemet. De nylig oppdagede sporamin-assosierte reseptorene (TAARs), der sporaminer fungerer som ligander, er et aktivt forskningsfelt. Betydningen av synefrin i forhold til disse reseptorene er ikke beskrevet, men stoffet kan tenkes å ha en effekt i likhet med oktopamin. (18, 24)

Synefrin er påvist i ulike typer plantemateriale. Et stort antall ulike sitrusfrukter har blitt studert for innhold av synefrin. Spesielt har arten *Citrus aurantium* vist seg å være rik på synefrin. *Citrus aurantium* blir også omtalt under navnene Seville orange (engelsk), bitterappelsin eller pomerans på norsk. Forskjellige bestanddeler av planten blir anvendt i blant annet marmelade og te, og som smaksimtilsetning i ulike mat- og drikkevarer. Planten har også vært brukt i tradisjonell asiatisk og vestlig urtemedisin. (29) I tillegg til synefrin inneholder *C. aurantium* små mengder oktopamin. Avhengig av hvor planten dyrkes, varierer innholdet av synefrin i de ulike bestanddelene av planten. Generelt inneholder tørket fruktmateriale mer synefrin enn fersk frukt, og innholdet av synefrin i skallet av appelsinen er høyere enn for andre bestanddeler av frukten. (16, 29, 30)

Etter at efedrin ble forbudt som tilsetning i kosttilskuddsprodukter, mye på grunn av mange rapporter om hjerte-kar-relaterte bivirkninger, har mange av produsentene erstattet *Ephedra sinica* med *C. aurantium*. Produktene blir ofte markedsført for sin slankende effekt. Ekstraktet har lignende effekter som efedrin, men den sentralstimulerende effekten er mindre. (29) Noen påstår også at *C. aurantium* har mindre effekt på hjerte-karsystemet enn efedrin, og at det dermed er mindre sannsynlighet for at uheldige hjerte-karrelaterte bivirkninger skal oppstå. Dette er imidlertid omdiskutert, og flere studier har forsøkt å kartlegge faren for bivirkninger ved inntak av *C. aurantium*, men konklusjonene er sprikende. (28, 29, 31, 32)

Biosyntese og metabolisme

På samme måte som oktopamin blir også *p*- og *m*-synefrin syntetisert i sentralnervesystemet via de samme synteseveiene som noradrenalin og adrenalin. Fra aminosyren L-fenylalanin, via enzymene tyrosin hydroksylase, aromatisk L-aminosyre dekarboksylase og dopamin β -hydroksylase dannes oktopamin, og ved hjelp av enzymet fenyletanolamin-*N*-metyltransferase dannes synefrin fra oktopamin. (24) Biosyntesen er vist skjematisk i figur 1.2.

Metabolisme av synefrin skjer i hovedsak via enzymet monoaminoksidase (MAO). Deaminering av *p*- og *m*-synefrin via MAO gir metabolittene *p*- og *m*-hydroksymandelsyre. Synefrin metaboliseres også i mindre grad til ulike konjugater. (24, 33)

En studie så på utskillelsen av synefrin i urin etter inntak av mellom 60 og 70 g skall fra sitrusplanten *Citrus unshiu* (norsk: satsuma). Urinprøvene ble hydrolysert før analyse, så mengden synefrin som ble bestemt var en kombinasjon av både konjugert og eventuelt fritt synefrin. Høyest utskilleleshastighet ble sett etter 2-3 timer etter inntak, og etter 16 timer kunne man ikke lenger detektere synefrin i prøvene. Studien indikerte også at kiralt omdannelse av synefrin skjer i kroppen siden *C. unshiu* kun ble påvist å inneholde *l*-synefrin, mens man etter inntak kunne påvise både *l*- og *d*-isomeren av synefrin. Maksimal utskilleleshastighet lå i området 150-250 $\mu\text{g}/\text{time}$. (34)

1.3 Analyse av stimulerende stoffer

Biologisk materiale som urin og blod er komplekse blandinger av stoffer som i de fleste tilfeller ikke kan analyseres direkte. Prøvene inneholder stoffer som for eksempel proteiner og salter som kan interferere med analysen. Derfor er prøveoppbehandling et viktig trinn for sluttresultatet. Stoffer i prøvematerialet kan være problematisk for analysen av flere årsaker:

- Prøvene kan inneholde stoffer som gir respons i analyseinstrumentet som ikke kan skilles fra responsen til analytten
- Prøven kan inneholde stoffer som kan ødelegge analysesystemet
- Konsentrasjonen av analytt i prøven kan være så lav at den ikke direkte kan detekteres slik at oppkonsentrering er nødvendig

Det fins flere fremgangsmåter som kan benyttes innen prøveopparbeidelse. Man kan fjerne forurensninger fra det biologiske materialet, for eksempel ved proteinfelling, eller man kan isolere analytten fra det biologiske materialet slik at forurensninger blir igjen. Hvis konsentrasjonen av analytt i prøven er veldig lav kan oppkonsentrering legges til som et trinn i prøveopparbeidelsen.⁽³⁵⁾ I dette tilfellet isoleres og oppkonsentreres de aktuelle analyttene ved hjelp av ekstraksjon.

1.3.1 Intern standard

Intern standard er et stoff som tilsettes prøven i kjent konsentrasjon før prøveopparbeidelsen starter. Hensikten med en intern standard er å korrigere for tilfeldige feil som kan skje i løpet av opparbeidelsen og analysen. Slike feil kan være tap av stoff under opparbeidelse, variasjon i injeksjonsvolum eller tilfeldige variasjoner under den kromatografiske analysen. Ved å benytte arealforholdet mellom intern standard og analytt korrigeres resultatene for tilfeldige feil. En god intern standard bør oppfylle visse krav:

- Den bør oppføre seg fysisk-kjemisk mest mulig likt som analytten under hele analyseprosessen
- Den må ikke være tilstede i prøven fra før
- Den må ikke interagere med andre forbindelser i prøven.
- Den må kunne separeres fra andre stoffer i prøven, spesielt med tanke på den aktuelle analytten
- Den bør tilsettes i en konsentrasjon som gir respons i samme størrelsesorden som analytten

Innenfor massespektrometri vil en ideell internstandard være en deuterert variant av analytten. I deutererte forbindelser er et eller flere hydrogenatom byttet ut med deuterium, som er et hydrogenatom med et ekstra nøytron og som derfor er en masseenheter tyngre enn hydrogen.

Analytten og den interne standarden vil ha samme kjemiske struktur og oppføre seg likt under analysen, men massen til stoffene vil være forskjellig slik at de kan bestemmes separat ved hjelp av MS. Den deutererte interne standarden bør derfor ha minimum tre deuterium i strukturen slik at den ikke interfererer med den naturlige isotopfordelingen til analytten. (36-38)

Til denne oppgaven var det ikke mulig å skaffe deutererte interne standarder. I stedet ble den meta-substituerte analogen til hver av analyttene valgt. Disse er meget strukturenlige, og retensjonstiden ligger i samme område som for analyttene. Fenylefrin ble valgt som intern standard for synefrin og norfenefrin ble valgt som intern standard for oktopamin. Figur 1.4 viser strukturen til de interne standardene.

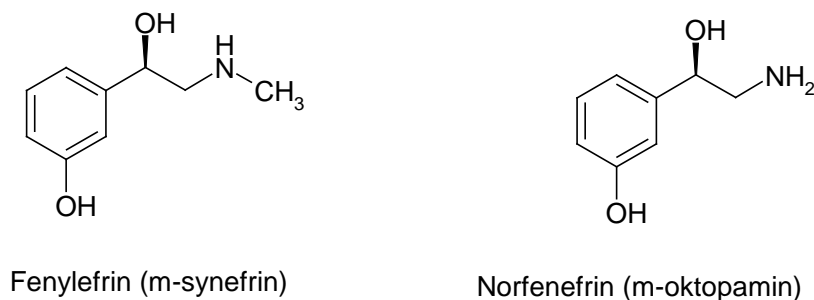


Fig. 1.4 Strukturen til de interne standardene

1.3.2 Hydrolyse

For at kroppsfrremmede stoffer skal kunne skilles ut i urin må de som oftest gjøres inaktive og mer polare. Ved hjelp av enzymsystemer i kroppen kobles forskjellige grupper på stoffet som skal skilles ut. Hydroksyl-, tiol- og aminogrupeer er egnede "håndtak" for tilkobling av andre grupper. Denne prosessen kalles konjugering, og omtales også som fase II-metabolisme. De fleste konjugeringsreaksjonene foregår i leveren, men stoffer kan også metaboliseres andre steder i kroppen som i lungene og nyrene. Eksempler på konjugeringsreaksjoner er interaksjon med glukuronsyre for å danne glukoronider eller overføring av sulfat for å danne sulfateter. Andre grupper som kan konjugeres til et stoff er metyl, acetyl og glutation. (8)

For å få best mulig utbytte av analyttene, og for å bedre sensitiviteten til analysemetoden, må bindinger til konjugatgrupper på molekylene brytes slik at en størst mulig andel av analytten

foreligger fritt i prøven før opprensing. Spalting av molekylene gjøres ved hjelp av hydrolyse. Hydrolysen kan utføres etter to prinsipper:

Kjemisk hydrolyse utføres ved hjelp av sterke syrer eller baser, ofte i kombinasjon med oppvarming av prøveløsningen. Prosessen er lite spesifikk og relativt kraftig, og ofte kan det bli et problem med nedbryting av analytten eller dannelse av uønskede artefakter. pH-justering er ofte nødvendig etter den kjemiske hydrolysen før man skal utføre ekstraksjoner. Fordelen er at det er en rask, rimelig og robust metode.

Et annet alternativ er enzymatisk hydrolyse. Her benyttes spesielle enzymer til å bryte bindinger til konjugatgrupper. Mest vanlig er glukuronidaser og sulfataser. Enzymene muliggjør en spesifikk og skånsom hydrolyse av analyttene, og man oppnår et noe renere produkt enn ved kjemisk hydrolyse. Metoden er mindre robust enn kjemisk hydrolyse, og det er viktig å ha kontroll med pH og temperatur for at enzymene skal fungere optimalt. Siden enzymene er naturprodukter og krevende å produsere, blir metoden mer kostbar enn kjemisk hydrolyse. (39)

1.3.3 Fast-fase ekstraksjon

Fast-fase ekstraksjon (SPE) er en prøveopparbeidelsesmetode der man utnytter stoffers ulike evne til å adsorbere seg til overflaten av et fast stoff (sorbent). Sorbenten er vanligvis pakket i kolonner som utgjør praktiske beholdere for væsken som skal føres gjennom sorbenten, oftest ved hjelp av vakuum. Funksjonelle grupper på overflaten av sorbenten vil interagere med stoffer i prøveløsningen, og de stoffene som interagerer sterkere med sorbenten enn med væsken vil holdes igjen på den faste fasen. For ekstraksjon av vandige løsninger, slik som urin, velger man enten en omvendt-fase-sorbent som har hydrofobe egenskaper, eller en ionebyttersorbent der man utnytter ioniserbare grupper. En god sorbent interagerer selektivt med de analyttene man ønsker å ekstrahere, og minst mulig med andre forurensninger i prøven som man ønsker å kvitte seg med. Sorbentene kan være enten silikabaserte eller polymerer. Polymere materialer er mer robuste enn silikabaserte materialer, de kan benyttes i et bredere pH-område og er mindre ømfintlige overfor uttørking av sorbenten.

En fast-fase ekstraksjon består i hovedsak av fire trinn. Først må sorbenten kondisjoneres slik at overflaten blir aktivert og klar for å ta imot prøveløsning. I tilfellet for urinprøver der det

brukes omvendt-fase- eller blandet-fase-sorbenter kondisjoneres sorbenten med et organisk løsemiddel, gjerne metanol. Sorbenten vaskes så med vann for å fjerne løsemiddelrester, før prøven kan settes på. Når prøven er påsatt sorbenten kan man vaske ut uønskede forurensninger. Vaskeløsningen må kunne bryte eventuelle interaksjoner mellom sorbenten og uønskede forurensninger fra prøven, men må ikke være så sterk at analytten løsner fra sorbenten. Til slutt elueres analytten med et løsningsmiddel som er så sterkt at interaksjonen mellom sorbent og analytt brytes.

I denne oppgaven ble det benyttet en blandet-fase-sorbent (mixed mode), som er en kombinasjon av en omvendt-fase- og en ionebyttersorbent. Siden analyttene i dette tilfellet er baser ble det valgt en kationbytter. Kolonnen som blir brukt til fast-fase-ekstraksjonen, Oasis MCX fra Waters, har en polymerbasert sorbent bestående av polyvinylpyrrolidon-divinylbenzen kopolymer modifisert med sulfonsyregrupper som gir interaksjon med hydrofobe og basiske stoffer. Figur 1.5 viser strukturen til sorbenten. Når man benytter en blandet-fase-sorbent kan man vaske med et organisk løsemiddel i kombinasjon med enten en sur eller en basisk løsning for å få et enda renere ekstrakt. I dette tilfellet blir det vasket med 0,1 M saltsyre, og analyttene elueres ved hjelp av basisk metanol. (38, 40, 41)

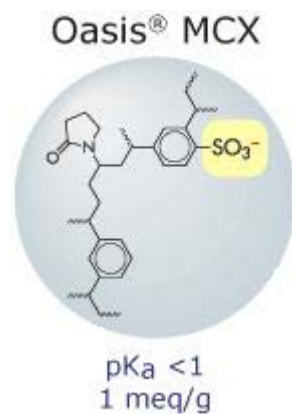


Fig 1.5 Strukturen til blandet-fase-sorbenten (41).

1.3.4 Væske-væske-ekstraksjon

Væske-væske-ekstraksjon (LLE) er en prøveopparbeidelsesmetode der man utnytter stoffers evne til å fordele seg mellom to ikke-blandbare væsker. Væskene utgjør en organisk fase og en vandig fase. Stoffer i fasene vil fordele seg ut ifra en likevekt, og fordelingskoeffisienten

til et stoff bestemmer hvilken fase stoffet vil oppholde seg mest i. Fordelingskoeffisienten kan påvirkes gjennom valg av løsningsmiddel, pH og ionestyrke. Disse parametrene kan optimaliseres med tanke på analyttene slik at man får best mulig utbytte av ekstraksjonen. I mange tilfeller er man interessert i å kunne dampe av løsemiddelet etter ekstraksjonen, og det er derfor gunstig å velge et lett flyktig løsemiddel.

I dette tilfellet utgjør urinprøven selv den vandige fasen. *Tert*-butylmetyleter (TBME) er et mye brukt løsningsmiddel som egner seg godt til ekstraksjon av organiske stoffer, og ble valgt som den organiske fasen. Ekstraksjonen foregår i to trinn. Først vaskes den vandige fasen med TBME. Siden de basiske analyttene vil foreligge som ioner i prøveløsningen som er sur etter hydrolysen, vil hydrofobe forurensninger trekke over i den organiske fasen. Den organiske fasen kastes mens den vandige fasen spares, og pH justeres slik at løsningen blir basisk og analyttene ikke lenger er ionisert. Ved å igjen ekstrahere analyttene med *tert*-butylmetyleter vil de overføres til den organiske fasen, og man oppnår et renere ekstrakt enn om man hadde ekstrahert analyttene direkte fra den opprinnelige prøveløsningen.(42)

1.3.5 Derivatisering

For at stoffer skal kunne analyseres ved hjelp av gasskromatografi må de kunne overføres til en gassfase. Polare funksjonelle grupper som hydroksyl-, amino- og karboksylsyregrupper nedsetter stoffers flyktighet, og dette er grupper som ofte finnes i biologiske molekyler og legemidler. Ved å maskere en eller flere hydrofile grupper i et molekyl med mindre polare funksjonelle grupper, kan et stoff gjøres mer flyktig og termisk stabilt slik at det blir bedre egnet for GC. Denne prosessen kalles derivatisering. Derivatisering gjøres oftest ved hjelp av forestrings- og forestringsreaksjoner. Fordelene ved derivatisering er blant annet at man kan få en bedre separasjon, smalere kromatografiske topper og mindre haledannelse, noe som i mange tilfeller vil gi lavere deteksjonsgrenser og mer karakteristiske fragmenter som kan gi en sikrere identifikasjon av analyttene.

Analyttene i denne studien er fenolalkylaminer. Derivatiseringsreagenset som benyttes er *N*-metyl-*N*-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid (MSTFA). Aktive hydrogenatomer i fenol-, hydroksyl- og aminogrupper i analyttmolekylet erstattes med en trimetylsilylgruppe. (38, 43)

1.3.6 Gasskromatografi

Gasskromatografi (GC) er en separasjonsmetode som egner seg til analyse av flyktige stoffer. Grunnprinsippet bak separasjon er stoffers evne til å fordele seg mellom to ulike faser, en stasjonærfase og en mobil fase. Mobilfasen er i tilfellet for gasskromatografi en inert gass, kalt bæregass, som driver molekylene fra prøven gjennom en oppvarmet kolonne. Den stasjonære fasen befinner seg inne i kolonnen og kan være enten en væske eller et fast stoff. I dette tilfellet blir det benyttet en kapillærkolonne der stasjonærfasen er en høyviskøs væske som dekker innsiden av kolonnen som en tynn film. Her er stasjonærfasen fenylmetylsiloksan, som er en relativt upolar stasjonærfase, men innholdet av noen fenylgrupper gir den litt polare egenskaper.

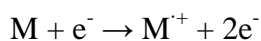
Siden prøvene foreligger i væskeform etter opparbeidelsen må de gjøres om til gass før de kan føres inn på kolonnen. Det gjøres ved at prøveløsningen injiseres inn i et varmt injektorkammer der prøven fordampes. Her blir det brukt splittinjeksjon. Det vil si at for å hindre overbelastning vil kun en liten fraksjon av den store mengden gass som dannes når prøven går fra væske til gassform sendes inn til kolonnen. Når prøven i gassform drives gjennom kolonnen av bæregassen vil molekylene i ulik grad fordele seg mellom stasjonærfasen og bæregassen, avhengig av deres fysisk-kjemiske egenskaper. De analyttene som i størst grad fordeler seg til den stasjonærfasematerialet vil bli holdt igjen lengst på kolonnen. Separasjonen kan påvirkes ved å justere forskjellige parametre som temperaturen på kolonnen og hastigheten på bæregassen. Ved temperaturprogrammering vil stoffer med høyt kokepunkt kondensere ved begynnelsen av kolonnen, og vil forbli der til temperaturen på kolonnen overstiger det aktuelle stoffets kokepunkt. Stoffene det analyseres på i denne studien er små polare molekyler som vil ha liten interaksjon med stasjonærfasen, og vil derfor ha en kort retensjonstid på kolonnen. Ved utgangen av kolonnen er det plassert en detektor, som i dette tilfellet er et massespektrometer. (43)

1.3.7 Massespektrometri

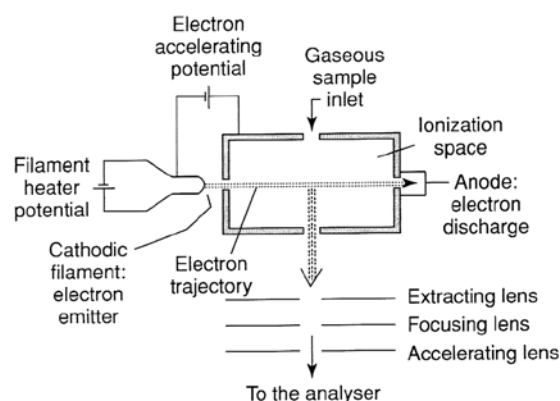
Massespektrometri (MS) utføres ved hjelp av et massespektrometer. Det man måler i et massespektrometer er forholdet mellom masse og ladning (m/z) for ioner. I dette tilfellet er analyttene ioner som har en ladning på én, så det man i prinsippet måler er massen.

Massespektrometeret består av tre hoveddeler: en ionekilde, selve masseanalysatoren som filtrerer massene og en detektor. Alle delene i massespektrometeret er underlagt vakuum. (44)

I ionekilden ioniseres molekylene. Dette kan gjøres på flere måter, men prinsippet som brukes her er elektronionisasjon, EI. Dette prinsippet er gunstig å kombinere med GC fordi gassen med analyttene kan ledes direkte fra kolonnen og inn i ionekilden. Et filament i ionekilden sender ut elektroner som samles og akselereres i et spenningsfelt til en konstant energi, vanligvis 70 eV. De energirike elektronene treffer analyttmolekylene som kommer fra kolonnen, og fører til ionisering og fragmentering av analyttmolekylene. Vi får først dannet et positivt ladet molekylion, $[M^+]$. Dette har i prinsippet samme vekt som det opprinnelige analyttmolekylet. Molekylionene som dannes er positivt ladet fordi elektronene som sendes ut fra filamentet river løs et elektron fra analyttmolekylet på grunn av elektrisk frastøtning:

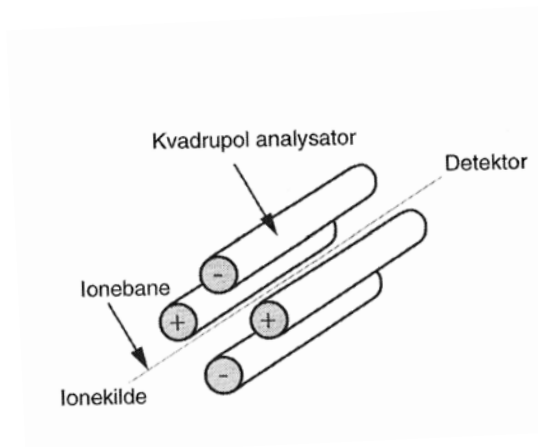


Molekylionene som dannes er relativt ustabile og vil fort fragmentere videre til fragmentioner. Disse fragmentionene danner et mønster som er spesifikt for hvert enkelt stoff, og kan sammen med retensjonstiden fra kromatografien brukes til å identifisere stoffene. Ionene som dannes i ionekilden tilføres energi i et elektrisk felt og drives samlet videre til masseanalysatoren. Prinsippet for EI er vist i figur 1.6.



Figur 1.6 Figur av ioniseringsprinsippet EI. (37)

Masseanalytorens funksjon er å separere ionene som dannes i ionekilden etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). Det finnes flere typer masseanalytorer som kan benyttes, men i dette tilfellet blir det benyttet en kvadrupol. Kvadrupolen består av fire parallelle staver som oftest er laget av metall. I dette tilfellet er stavene laget av kvarts som er dekket med et tynt lag gull. Filmen rundt stavene blir påsatt en elektrisk likespenning som gir motstående staver lik ladning, og ved påsetting av en vekselspanning vil parene veksle mellom å være positivt og negativt ladet. Mellom stavene vil det da oppstå et spenningsfelt, og ved å variere dette kan vi regulere hvilke av ionene som kommer fra ionekilden som passerer gjennom kvadrupolen, og går videre inn til detektoren. Prinsippet for en kvadrupol er vist i figur 1.7.

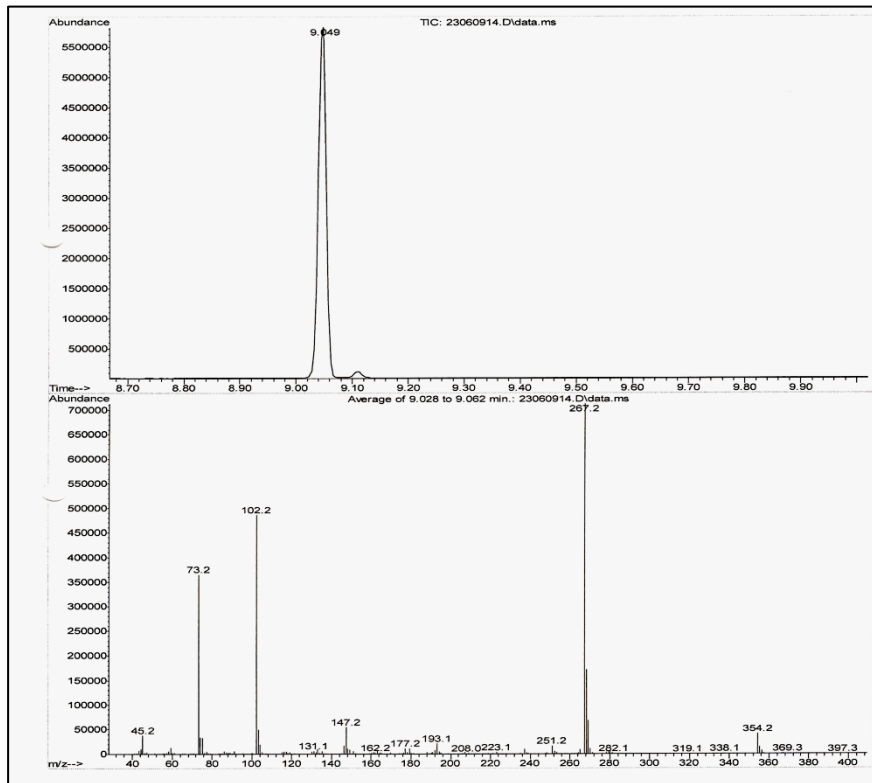


Figur 1.7 Skjematisk fremstilling av en kvadrupol. (44)

Detektoren sitter etter masseanalytoren i massespektrometeret, og når de utvalgte ionene kommer ut av masseanalytoren sender detektoren ut et elektrisk signal som er proporsjonalt med antallet ioner som passerer. Strømmen av molekyler fra kolonnen via ionekilden, masseanalytoren og detektoren er en kontinuerlig prosess, og ved hjelp av spesialiserte dataprogrammer får vi fremstilt et massespektrum som viser intensiteten av de ulike massene som passerte detektoren til et gitt tidspunkt. (44, 45)

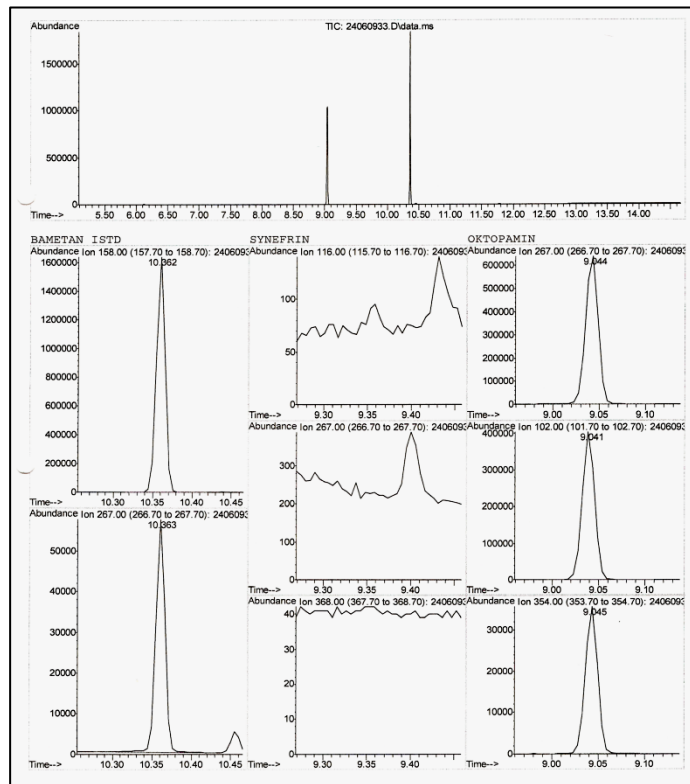
Massespektrometret kan når det kombineres med kromatografi opereres etter to forskjellige prinsipper. Man kan registrere alle massene som passerer detektoren under hele separasjonen, såkalt "full scan". Typisk registreres det 1-5 massespektra per sekund. Etter analysen kan det hentes ut et totalt ionestrømskromatogram som viser intensiteten til alle de registrerte ionene

summert for hvert massespektrum (total ionestrøm, TIC) plottet mot separasjonstiden. For hver topp i kromatogrammet kan man hente ut et massespektrum. ”Full scan” brukes hvis man ønsker mye strukturinformasjon om analyttene, men følsomheten er begrenset. Figur 1.8 viser et eksempel på et totalt ionestrømskromatogram etter en ”full scan”-analyse.



Figur 1.8 Eksempel på et totalt ionestrømskromatogram.

Ønsker man derimot å detektere stoffer i svært lave konsentrasjoner eller man skal utføre kvantitative bestemmelser, slik som i denne studien, kan man benytte selektiv ionemonitorering, SIM. Da ser man kun på et bestemt ion eller noen få utvalgte ioner under tidsrommet for separasjonen, noe som øker følsomheten til analysemetoden. Etter analysen kan det hentes ut et massekromatogram der intensiteten til de utvalgte ionene er plottet mot retensjonstiden. Kun forbindelser i prøven som fragmenteres til de ønskede ionene vil vises som topper i kromatogrammet. Figur 1.9 viser et eksempel på et massekromatogram etter en SIM-analyse. (44)



Figur 1.9 Eksempel på et massekromatogram.

1.3.8 Identifikasjon og kvantifisering

Identifikasjon av stoffene gjøres ved at man velger ut noen ioner som er karakteristiske for den aktuelle analytten. Så sammenlignes retensjonstiden og forholdet mellom de ulike ionene med informasjon fra en kontrollprøve med kjent innhold av den aktuelle analytten.

Ved kvantifisering tar man utgangspunkt i at arealet av en topp i kromatogrammet er proporsjonalt med konsentrasjonen av stoff i prøven. En kalibreringskurve opprettes ved at ulike kontrollprøver med kjent konsentrasjon av analytt analyseres. Forholdet mellom areal av analytt og internstandard plottes som en funksjon av konsentrasjonen i prøven, og konsentrasjonen av analytt i ukjente prøver kan bestemmes ut ifra kalibreringskurven. Kurven bør bestå av minimum 5 prøver med forskjellige konsentrasjoner som dekker det aktuelle kvantifiseringsområdet. (36, 44)

1.4 Problemstilling

Oktopamin er i følge WADAs Prohibited List et forbudt stoff i konkurranse. Synefrin er imidlertid ikke forbudt, men er gjenstand for observasjon i et Monitoring Program. (7) Oktopamin har vært en del av en større screeninganalyse ved Norges laboratorium for dopinganalyse sammen med fenylefrin. Synefrin har også vært inkludert i screeninganalyser, men følsomheten har vært lav. Etter at efedrin ble forbudt som tilsetningsstoff i kosttilskuddspreparater har mange produsenter erstattet efedrin med synefrin eller synefrinholdige planteekstrakter. Oktopamin har i senere tid vært mye omtalt for sine påståtte lipolytiske egenskaper, og flere kosttilskuddspreparater med dette innholdsstoffet har kommet på markedet. Det var derfor ønskelig å utarbeide en analysemetode for deteksjon og kvantifisering av de stimulerende stoffene synefrin og oktopamin i urin.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en analysemetode som var mer spesifikk for oktopamin og synefrin med tilhørende internstandarder, og som med en 5-punkts kalibreringskurve også gjorde det mulig å kvantifisere innholdet av stoffene i urinprøver. Det var ønskelig å definere et normalområde for disse stoffene i urin slik at man vet hvilke konsentrasjonsområder man kan forvente å finne de stimulerende stoffene i. Siden stoffene er biogene aminer som naturlig vil være til stede i urin var det også ønskelig å anvende analysemetoden til å se om man kunne sette en grenseverdi for naturlig utskillelse i urin og eventuell utskillelse etter preparat- eller næringsmiddelinntak.

2 Eksperimentelt

2.1 Forsøkspersoner

Før utskillelsesforsøket kunne settes i gang måtte prosjektet godkjennes av Regional etisk komité. Det måtte også søkes om godkjenning for opprettelse av biobank. En søknad som beskrev formålet med studien, hvordan den skulle gjennomføres, konsekvenser ved deltagelse samt beskrivelse av studien til forsøkspersonene og tilhørende samtykkeskjema ble sendt til Regional etisk komité (REK). Etter positivt svar fra REK kunne rekrutteringen av forsøkspersoner begynne.

Friske frivillige personer ansatt ved Norges laboratorium for dopinganalyse ble rekruttert som forsøkspersoner. Alderen spente fra 24-60 år og både kvinner og menn ble inkludert. Informert samtykke ble samlet inn fra alle deltagerne. Før de frivillige fikk klarsignal til å delta i forsøket måtte de oppfylle noen forhåndsbestemte medisinske kriterier. Generelt for stimulerende midler er at de ikke bør benyttes av personer med høyt blodtrykk, diabetes, glaukom eller hypertyreose. Også de som eventuelt benyttet antidepressive medisiner ble ekskludert. Kvinner i fertil alder måtte ikke være gravide ved oppstart av forsøket og sikker prevensjon måtte benyttes så lenge forsøket varte, da man ikke har kartlagt effekter av synefrin og oktopamin på foster eller fosterutvikling. Blodtrykk ble også målt før oppstart for å minimere risikoen for bivirkninger hos forsøkspersonene.

Under forsøket ble det anbefalt at deltagerne ikke skulle innta store mengder av koffeinholdige produkter da dette kan føre til en økt stimulerende effekt av synefrin og oktopamin. Det var også ønskelig at forsøkspersonene skulle begrense inntaket av sitrusholdige næringsmidler under forsøket for å unngå påvirkning av resultatene.

I utgangspunktet var det ønskelig med 10 forsøkspersoner i hver av gruppene. På grunn av tidsbegrensninger var det ikke mulig å rekruttere så mange personer, og hver gruppe ble til slutt bestående av 3 personer.

2.2 Organisering av forsøk

2.2.1 Forforsøk

Ulike forforsøk ble utført som forberedelse før hovedforsøket ble satt i gang. Innhold av synefrin og oktopamin ble undersøkt i ulike kosttilskuddspreparater og næringsmidler, samt at utskillelsesprofilen til synefrin og oktopamin ble kartlagt hos én person for å få et bilde av hvordan hovedforsøket og analysen skulle legges opp.

Analyse av kosttilskuddspreparater

To forskjellige kosttilskuddspreparater ble benyttet under hovedforsøket. Disse ble på forhånd analysert for å bekrefte oppgitt innhold av virkestoff i forhold til deklarasjonen.

Synefrinpreparatet som ble analysert var Synephrine "Top Formula" med oppgitt innhold av *Citrus aurantium* tilsvarende 100 mg synefrin, og oktopaminpreparatet som ble analysert var Beta 3 Metabolic Optimizer "Syntrax" oppgitt å inneholde 500 mg oktopamin. Tre paralleller av hver tablett og kapsel ble løst opp i 1 M saltsyre, fortynnet med metanol, tilsatt intern standard, dampet inn, derivatisert med MSTFA og analysert for innhold av henholdsvis synefrin og oktopamin ved hjelp av GC/MS. Innholdet av synefrin og oktopamin ble kvantifisert ut ifra en referanseprøve som inneholdt en kjent mengde av den aktuelle analytten.

Analyse av næringsmidler

Ulike næringsmidler ble undersøkt for innhold av synefrin og oktopamin. Næringsmidlene ble valgt ut på bakgrunn av tilgjengelig litteratur, med tanke på å kartlegge naturlige kilder til synefrin og oktopamin i et vanlig kosthold. Tre forskjellige typer appelsinjuice, både naturlig presset og fra konsentrat, ble analysert. To typer appelsinmarmelade med biter av appelsinskall, en norsk og en engelsk oppskrift, ble analysert med tanke på at innholdet av synefrin i appelsinskall er høyere enn i selve frukten. Pulver av pomeransskall (bitterappelsin) er en vanlig smakstilsetning i blant annet bakevarer, og ble analysert med tanke på at innholdet av synefrin her kunne være høyt. Soyasaus ble analysert med tanke på at oktopamin er et amin som kan dannes i større mengder i fermenterte produkter. Kakaopulver ble også analysert med tanke på oktopamin, siden kakao generelt er rikt på biogene aminer (19), men ingen kilder ble funnet i litteraturen som skulle tilsi et høyt oktopamininnhold. Produktene er spesifisert i tabell 2.1. 1 ml av de forskjellige appelsinjuicetyperne samt soyasaus ble fortynnet i 1 M saltsyre. En liten mengde appelsinmarmelade ble først homogenisert, og 1 g

homogenisert appelsinmarmelade, pomeransskall og kakaopulver ble løst i 1 M saltsyre. Løsningene ble varmet opp ved 70 °C i 1 time, sentrifugert, og supernatanten ble fortynnet med metanol før den igjen ble sentrifugert. Supernatanten ble så tilsatt intern standard, dampet inn og derivatisert med MSTFA før den ble analysert ved hjelp av GC/MS. Innholdet av synefrin og oktopamin ble kvantifisert ut ifra en referanseprøve som inneholdt en kjent mengde av den aktuelle analytten.

Tabell 2.1 Næringsmidler som ble analysert

Næringsmiddel	Produsent
Lerums utvalde appelsinjus (ikke fra konsentrat)	Lerum Fabrikker AS, Sogndal, Norge
Nora 100% naturlig Appelsinjuice (fra konsentrat)	Stabburet AS, Kolbotn, Norge
First Price Appelsinjuice (fra konsentrat)	Unil AS, Oslo, Norge
Noras hjemmelagede appelsinmarmelade	Stabburet AS, Kolbotn, Norge
Fru Bennett's Bitter Appelsin Marmelade	Sara Lee Household & Body Care Norge AS, Kolbotn, Norge
Pomeransskall malt	Apotekproduksjon AS, Oslo, Norge
Blue Dragon Soyasaus	Haugen-Gruppen AS, Vestby, Norge
Freia Regia Bakekacao pulver	Kraft Foods Norge, Oslo, Norge

Økt utbytte av væske-væske-ekstraksjon

Siden den opprinnelige væske-væske-ekstraksjonsmetoden gav et lavt utbytte av analyttene var det ønskelig å se på mulighetene for å optimalisere metoden, og øke utbyttet av synefrin og oktopamin. Inndamping av standardløsningene i reagensglassene før opparbeidelsen startet ble prøvd ut. Siden standardløsningene var laget i metanol var det ønskelig å se i hvilken grad innholdet av metanol påvirket ekstraksjonsutbyttet. Det ble også forsøkt å øke mengden organisk fase som ble benyttet til ekstraksjon fra 2,5 ml til 5 ml. Etter analyse på GC/MS ble resultatene sammenlignet.

Utskillelsesforsøk

For å få et bilde av utskillelsesprofilen til de to stoffene fikk én frisk frivillig administrert henholdsvis en synefrin tablett og en oktopamin kapsel på separate tidspunkt. En blank referanseprøve (spot) ble avlagt før inntaket, og urin ble samlet til bestemte tidspunkter i 24 timer etter inntak. Tidsintervallene var som følger: 0-2 timer, 2-4 timer, 4-6 timer, 6-9 timer,

9-14 timer og 14-24 timer. En spotprøve ble også samlet etter 48 timer. Prøvene ble så opparbeidet og analysert for innhold av henholdsvis synefrin og oktopamin, og gjennomsnittlig utskilleleshastighet ble beregnet.

2.2.2 Hovedforsøk

Hver forsøksperson gjennomførte tre utskillelser av urin etter inntak av henholdsvis en bestemt mengde bitterappelsinmarmelade, en tablett synefrinholdig kosttilskuddspreparat og en kapsel oktopaminholdig kosttilskuddspreparat. En blank referanseprøve (spot) ble avlagt før hvert inntak, og all urin ble samlet til bestemte tidspunkter i 24 timer etter inntak. Tidsintervallene ble justert etter resultatene fra forforsøket slik at det ble flere korte intervaller. En spotprøve ble også lagt til etter 72 timer for å se at konsentrasjonsnivået gikk tilbake til utgangspunktet. Tidsintervallene var som følger: 0-2 timer, 2-4 timer, 4-6 timer, 6-8 timer, 8-10 timer, 10-12 timer og 12-24 timer. En spotprøve ble også samlet etter 48 og 72 timer. Prøvene ble oppbevart kjølig (4 °C) til de ble analysert.

Hovedforsøket ble satt opp slik at hver forsøksperson fungerte som sin egen kontroll.

2.3 Kjemikalier og utstyr

Alle kjemikaliene som ble benyttet til analysen var av analysekvalitet, HPLC-kvalitet eller bedre.

Tabell 2.2 Referansestoffer og interne standarder brukt til analysen

Stoff	Leverandør
Bametan	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Fenylefrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Norfenefrin	United States Pharmacopeia (USP), Rockville, MD USA
Oktopamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Synefrin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

Tabell 2.3 Kjemikalier benyttet til prøveopparbeidelse.

Kjemikalie	Leverandør
β -glukoronidase/arylsulfatase, <i>Helix pomatia</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Tyskland
Ammoniakk, 32 %	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Cysteinklorid	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Eddiksyre	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Ionerenset vann	Milli-Q, Millipore Corporate, Billerica, MA USA
Kaliumhydroksid, KOH	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Metanol	VWR International, Oslo, Norge
MSTFA, N-metyl-N-(trimetylsilyl)trifluoroacetamid	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Tyskland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland (?)
Natriumbikarbonat, NaHCO ₃	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Natriumkarbonat, Na ₂ CO ₃	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Natriumsulfat, Na ₂ SO ₄	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Saltsyre, 37 %	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
<i>Tert</i> -butanol	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
<i>Tert</i> -butylmetyleter	Merck KGaA, Darmstadt Tyskland
Trimetylklorasilan, TMSCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA

Tabell 2.4 Utstyr til prøveopparbeidelse

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Fast-fase kolonne	Oasis MCX	Waters Corporation, MA USA
Fast-fase manifold	Visiprep 24	Supelco, Bellefonte, PA USA
Homogenisator	Ultra-Turrax T25	IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Tyskland
Nitrogen inndampere	Techne Sample Concentrator	Bibby-Scientific Ltd, Staffordshire, UK
Ristemaskin	Edmund Bühler SM25	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Tyskland
Sentrifuge	Rotixa 50 RS	Hettich AG, Bäch, Sveits
Vannbad	Water bath SWBD	Bibby-Scientific Ltd, Staffordshire, UK

Varmeskap	Termaks	VWR International, Oslo, Norge
Varmeblakk	Techne Dri-Block DB3	Bibby-Scientific Ltd, Staffordshire, UK
Vannrenser	Milli-Q	Millipore Corporate, Billerica, MA USA
Vekt	Mettler Toledo MT5	Mettler -Toledo, Oslo, Norge
Whirlmikser	Labinco L25	Labinco BV, Breda, Nederland

Tabell 2.5 Utstyr til GC-MS

Utstyr	Typebetegnelse	Leverandør
Autosampler	Agilent 7683 Series Autosampler	Matriks AS, Oslo, Norge
GC	Agilent 6890N Network GC System	Matriks AS, Oslo, Norge
Injektor	Agilent 7683 Series Injector	Matriks AS, Oslo, Norge
MS	Agilent 5973 Network Mass Selective Detector	Matriks AS, Oslo, Norge
Dataprogram	Agilent MSD Chemstation Software, version D 03.00.611	Matriks AS, Oslo, Norge

2.4 Løsninger

2.4.1 Bruksløsninger til prøveopparbeidelse

6 M HCl

500 ml konsentrert saltsyre (12 M) fortynnes til 1000 ml med rensert vann i en målekolbe.

1 M HCl

20 ml 6 M saltsyre fortynnes med 100 ml rensert vann i en passende beholder.

0,1 M HCl

10 ml 6 M saltsyre fortynnes med 590 ml rensert vann i en passende beholder.

2 M eddiksyre (til acetatbuffer)

114 ml 100 % eddiksyre fortynnes med vann til 1000 ml i målekolbe.

2 M natriumacetat (til acetatbuffer)

164 g natriumacetat løses og fortynnes med renset vann til 1000 ml i målekolbe.

Acetatbuffer, pH 5

138 ml 2 M eddiksyre blandes med 362 ml 2 M natriumacetat.

5 M KOH

280 g kaliumhydroksid, KOH, løses opp i ca 700 ml vann (kolbe i vannbad), og løsningen fortynnes til 1000 ml med renset vann.

5 % NH₄OH

(Tillages alltid samme dag som fast-fase ekstraksjonen utføres)

5 ml 32 % ammoniakk fortynnes til 100 ml med metanol i målekolbe. Blandes og plasseres på ultralydbad i 5 minutter.

2.4.2 Internstandarder

Stamløsninger av bametam, norfenefrin og fenylefrin lages ved å løse innveid mengde stoff i metanol til konsentrasjon 1 mg/ml. Ved innveiing tas det høyde for om stoffet foreligger som rent stoff eller i saltform. Ulike bruksløsninger av de interne standardene ble laget med utgangspunkt i stamløsningene som vist i tabell 2.6.

Tabell 2.6 Tillaging av bruksløsninger av interne standarder

Stoff	Stamløsning	Uttaksvolum	Løst i ml metanol	Bruksløsning
Bametam	1 mg/ml	500 µl	5 ml	100 ng/µl
Fenylefrin	1 mg/ml	500 µl	10 ml	50 ng/µl
Norfenefrin	1 mg/ml	500 µl	10 ml	50 ng/µl

2.4.3 Kalibratorløsninger

Stamløsninger av oktopamin og synefrin lages ved å løse innveid mengde stoff i metanol til konsentrasjon 1 mg/ml. Ved innveiling tas det høyde for om stoffet foreligger som rent stoff eller på saltform.

Fra stamløsningene lages bruksløsninger i metanol til bruk ved kvantifisering, som vist i tabell 2.7.

Tabell 2.7 Tillaging av bruksløsninger

Stoff	Uttaksløsning	Uttaksvolum	Løst i ml metanol	Bruksløsning
Oktopamin	1000 ng/μl	500 μl	5 ml	100 ng/μl
Oktopamin	100 ng/μl	500 μl	5 ml	10 ng/μl
Oktopamin	100 ng/μl	500 μl	10 ml	5 ng/μl
Oktopamin	10 ng/μl	500 μl	5 ml	1 ng/μl
Synefrin	1000 ng/μl	500 μl	5 ml	100 ng/μl
Synefrin	100 ng/μl	500 μl	5 ml	10 ng/μl
Synefrin	100 ng/μl	500 μl	10 ml	5 ng/μl
Synefrin	10 ng/μl	500 μl	5 ml	1 ng/μl

2.4.4 Standardkurve til kvantifisering

En standardkurve til kvantifisering av synefrin og oktopamin ble opparbeidet sammen med prøvene i utskillelsesforsøkene. Standardkurvene besto av 5 punkter som skulle dekke det aktuelle konsentrasjonsområdet. Konsentrasjonene av synefrin og oktopamin som ble benyttet er vist i tabell 2.8.

Tabell 2.8 Konsentrasjon av standardprøvene brukt i standardkurvene

Sluttkonsentrasjon (μg/ml)	Bruksløsning (ng/μl)	Uttaksvolum (μl)
0,1	5	40
0,5	5	200
1,0	10	200
2,5	100	50
5,0	100	100

2.5 Metodeutvikling

Metoden ble utviklet med utgangspunkt i allerede eksisterende opparbeidelses- og analysemetoder ved Norges laboratorium for dopinganalyse.

2.5.1 Forarbeid/forforsøk

Fullscan

For å få informasjon om retensjonstid, fragmentering, og hvilke fragmenter som var mest spesifikke og gav best signal for de ulike stoffene ble det kjørt fullscan av stoffene og internstandardene. 50 µl av en 100 ng/µl bruksløsning, tilsvarende 5 µg, for hvert av stoffene ble tatt ut i et reagensglass. Metanolen ble dampet av, og prøvene ble derivatisert med 100 µl MSTFA. Prøvene ble så analysert på GC-MS.

2.5.2 Prøveoppbeidelse

Væske-væske-ekstraksjon

Oktopamin og synefrin var i utgangspunktet inkludert i en større screeninganalyse ved Norges laboratorium for dopinganalyse. Denne screeninganalysen har imidlertid blitt avviklet og analyttene har blitt inkludert i andre screeninganalyser. Det var ønskelig å utvikle en analysemetode som var optimal for synefrin og oktopamin, og det ble først tatt utgangspunkt i den tidligere screeninganalysen. Opparbeidelsesmetoden besto av kjemisk hydrolyse kombinert med en væske-væske-ekstraksjon. Det er vanlig å utføre væske-væske-ekstraksjon i enten skilletrakter eller reagensrør. Siden volumet av prøvene i dette tilfellet er 2,5 ml var det mest hensiktsmessig å utføre ekstraksjonen direkte i reagensglasset.

Til hydrolysen ble det benyttet 6 M saltsyre sammen med cysteinklorid for å gjøre hydrolysen mer effektiv. Prøvene ble så vasket med *tert*-butylmetyler for å fjerne forurensninger som er løselige i TBME ved lav pH.. Den vandige fasen ble spart, gjort basisk med 5 M KOH og justert til pH 9,5 med Na₂CO₃/NaHCO₃-buffer. Løsningen ble ekstrahert på nytt med *tert*-butylmetyler tilsatt litt *tert*-butanol for å øke utbyttet. Den organiske fasen ble tilsatt trimetylsilylchlorid (TMSCl) for å nedsette flyktigheten av aminene, dampet inn til tørrhet og derivatisert med MSTFA. Prøvene ble analysert på GC-MS.

Siden analyttene er amfotære stoffer med både en sur fenolgruppe (pK_a 9,3 for synefrin) og et basisk aminogruppe (pK_a 10,2 for synefrin) (39) i strukturen er det vanskelig å få til en optimal væske-væske-ekstraksjon. For å få best mulig utbytte av analytten til den organiske fasen, bør stoffene i størst mulig grad foreligge på nøytral form. I en løsning med pH lik pK_a -verdien til et stoff, vil 50 % av stoffet foreligge på den nøytrale formen i løsningen. Siden analyttene her er amfotære molekyler, vil det å velge pH i den vandige løsningen lik en av pK_a -verdiene til analytten føre til at likevekten skyves mot ionisert form for den andre gruppen. I tillegg vil likevekter mellom vandig og organisk fase påvirke utbyttet. Når vi velger pH i den vandige fasen må den derfor bli et kompromiss mellom pK_a -verdiene til den sure og den basiske gruppen, som i dette tilfellet gir et smalt pH-vindu å arbeide innenfor, og som gjør det vanskelig å få godt utbytte.

Et forsøk ble gjort på validering av metoden. For oktopamin viste resultatene dårlig presisjon (> 30 % CV) og nøyaktighet (> 50 % avvik fra sann verdi) både intra-assay og inter-assay. Standardkurvene gav lav korrelasjonskoeffisient ($< 0,960$) og utbyttet av oktopamin ved lave konsentrasjoner var helt nede i 2 %. Også kvantifiseringen av synefrin hadde lav nøyaktighet (15-75 % avvik fra sann verdi) og dårlig presisjon (5-40 % CV), spesielt inter-assay. Utbyttet av synefrin ved lave konsentrasjoner var bare 10 %. Det var stor spredning i reproduserbarheten til internstandarder både for synefrin og oktopamin. På grunn av de dårlige resultatene fra valideringen av væske-væske-ekstraksjonsmetoden ble det valgt å gå videre med utviklingen av en fast-fase-ekstraksjonsmetode for opprensing av prøvene. Siden bametan viste seg å være en lite egnet intern standard for analyttene ble det også gjort forsøk med nye interne standarder.

Fast-fase-ekstraksjon

Siden væske-væske-ekstraksjonsmetoden var vanskelig å gjøre optimal for synefrin og oktopamin, og med tanke på at en væske-væske-ekstraksjon ofte gir lavere utbytte enn en fast-fase-ekstraksjon, var det ønskelig å se på mulighetene for å utvikle en opparbeidelsesmetode basert på fast-fase-ekstraksjon. Ved å ta utgangspunkt i andre opparbeidelsesmetoder for stimulerende midler ved Norges laboratorium for dopinganalyse der fast-fase-ekstraksjon ble benyttet, ble en fast-fase-ekstraksjonsmetode for synefrin og

oktopamin utviklet. Før ekstraksjonen ble prøvene hydrolysert med β -glukoronidase/arylsulfatase fra *Helix pomatia*.

En C18-kolonne (Bond Elut Certify) og en mixed-mode kolonne (Oasis MCX) ble testet ut. Mixed-mode-kolonner gir renere ekstrakter enn en C18-kolonne som ikke er så spesifikk, så derfor ble mixed-mode-kolonnen valgt videre til ekstraksjonen.

Trimetylklorosilan (TMSCl) var opprinnelig tenkt som tilsetning etter ekstraksjonen for å nedsette flyktigheten av aminene ved inndamping. Forsøk viste imidlertid at TMSCl dannet uløselige reaksjonsprodukter i kombinasjon med ammoniakk i elueringsløsningen. TMSCl, som blir omdannet til HCl og TMSOH ved reaksjon med vann, ble derfor byttet ut med 0,1 M HCl som ikke dannet noen uløselige reaksjonsprodukter, og som gav tilfredsstillende resultater.

Figur 2.1 viser prosedyren for den endelige prøveopparbeidelsesmetoden som ble benyttet til analyse av prøvene fra utskillelsesforsøkene.

I tillegg til prøvene ble det også opparbeidet en kalibreringskurve og en kontrollprøve hver gang. Kontrollprøven, som inneholder kjent mengde analytt, blir benyttet som en kontroll på kalibreringskurven.

2 ml uttak av alle prøver i 15 ml slipglass.

1. + 50 µl intern standard

2. + 0,5 ml 2 M acetatbuffer pH 5,0

Hydrolyse

3. + 50 µl β-glukoronidase/arylsulfatase (fra *Helix pomatia*).

4. Prøvene hydrolyseres i 3 timer ved 50 -55 °C i varmeskap, eller eventuelt i 24 timer ved 35 -39 °C i varmeskap.

5. Prøvene avkjøles til romtemperatur.

Fast fase-ekstraksjon (Kolonne: Oasis – MCX 60 mg)

6. Kolonnene vaskes med 2 ml metanol

7. Kolonnene ekvilibrerer med 2 ml rensset vann

8. Prøvene appliseres og renner langsomt gjennom kolonnene

9. Kolonnene vaskes med 2 ml 0,1 M HCl

10. Kolonnene tørkes med fullt vakuum, ca 2 minutter

11. Kolonnene vaskes med 2 ml metanol

12. Kolonnene tørkes med fullt vakuum, ca 2 minutter

13. Prøvene elueres i rene 10 ml slipglass med 2 x 1 ml nylaget 5 % NH₄OH i metanol

14. + 30 µl 0,1 M HCl

15. Prøvene dampes inn til tørrhet på varmeblokk ved 35 -40 °C under nitrogen

16. Prøvene skylles ned med 2 x 100 µl metanol og dampes inn på nytt til tørrhet.

Derivatisering

17. +100 µl MSTFA, korkes og mikses

18. Prøvene settes på varmeblokk ved 78-82 °C i ca. 10 min.

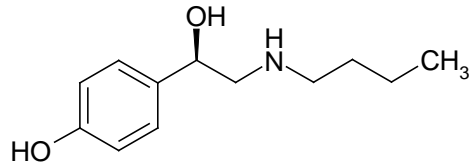
19. Prøvene romtempereres og overføres til autosamplerglass med insert.

20. Prøvene analyseres på GC-MS eller settes på kjølerom i påvente av analyse.

Fig. 2.1 Flytskjema for prøveopparbeidelse med fast-fase-ekstraksjon

2.5.3 Valg av internstandard

Bametan ble først prøvd ut som intern standard. Strukturen til bametan er vist i figur 2.2.



Bametan

Fig. 2.2 Struktur bametan.

Molekylet har lik grunnstruktur som oktopamin og synefrin, men har en noe lengre sidekjede som gjør molekylet litt mindre polart enn synefrin og oktopamin. Under valideringen av væske-væske-ekstraksjonsmetoden ble det klart at bametan oppførte seg for ulikt i forhold til synefrin og oktopamin under opparbeidelsen og analysen til at den fungerte som en god intern standard for analyttene.

Siden bametan ikke var egnet som intern standard for synefrin og oktopamin, ble det sett på egnetheten til andre interne standarder. Fenylefrin og norfenefrin ble testet og gav gode resultater. Disse ble derfor brukt videre som interne standarder. Fenylefrin ble benyttet som intern standard for synefrin og norfenefrin ble benyttet som intern standard for oktopamin. Strukturen til norfenefrin og fenylefrin er vist i figur 1.4.

2.5.4 Området for kalibreringskurven

Resultatene fra utskillelsesforsøket gjort i forkant av hovedforsøket ble lagt til grunn for hvilket område kalibreringskurven skulle dekke. De lave konsentrasjonene (ng/ml) av synefrin og oktopamin som naturlig vil kunne skilles ut i urin, samt de høye konsentrasjonene (µg/ml) som skilles ut etter inntak av synefrin og oktopamin gjorde det vanskelig å finne et anvendbart område der kalibreringskurven var lineær. Det var heller ikke hovedfokus for oppgaven å kunne kvantifisere lave konsentrasjoner av synefrin og oktopamin i urinprøver. En tilfredsstillende kurve ble derfor opprettet i det lave µg-området.

2.6 Analyseparametre

2.6.1 Instrument: GC-MS

GC-parametre

Kolonne:	J & W Ultra 2 kapillærkolonne, kryssbundet 5% fenylmetylsiloksan, 25 m x 0,2 mm, filmtykkelse 0,11 µm
Injeksjonsvolum:	1 µl
Splitt:	20:1
Bæregass:	Helium 0,4 ml/min, konstant flow

Temperaturprogrammet som ble benyttet var som følger: Starttemperatur 120 °C. Ovnens varmeså opp med 10 °C/min til 200 °C og videre med 30 °C/min til 320 °C. Temperaturen holdes konstant på 320 °C i 2 minutter.

MS -opptaksparametre

Ionisering:	Elektronionisasjon, EI
-------------	------------------------

For å få en mest mulig følsom analysemetode ble massespektrometret stilt inn på selektiv ionemonitorering, SIM. Opptak ble gjort i tidsrommet 5-14 minutter med 4,85 sykluser/s og dwelltid på 30 ms for hvert ion. Ionene det ble målt på var:

102,10	267,20
116,10	352,30
147,10	368,30

2.7 Identifikasjon og kvantifisering

Konsentrasjonen av stoffer som skilles ut i en urinprøve vil være avhengig av urinens spesifikke vekt. Et høyt væskeinntak gir en mer fortynnet urinprøve, noe som gir lavere konsentrasjon av stoffer i urin og som vil henseile seg i lav spesifikk vekt av urinprøven. Analogt vil et lavt væskeinntak gi en mer konsentrert urinprøve og prøven vil ha høy spesifikk vekt. En spesifikk vekt på 1,020 g/ml er definert som normalt.

For best mulig å kunne sammenligne ulike urinprøver måles spesifikk vekt for alle prøvene, og analysesvaret korrigeres etter følgende formel:

$$C_{\text{korrigeret}} = \left(\frac{1,020 - 1}{\text{spesifikk vekt} - 1} \right) * C_{\text{ukorrigeret}}$$

For å identifisere de ulike stoffene ble de mest karakteristiske ionene man så i fullscan-analysen under forarbeidene valgt som identifikasjonsioner. Kriteriene for positiv identifikasjon er at alle disse ionene er til stede, og at forholdet mellom intensiteten av ionene samsvarer med en positiv kontroll. Retensjonstiden til stoffene blir også benyttet til identifikasjon. Retensjonstider og identifikasjonsioner er listet opp i tabell 2.9.

Til kvantifisering av analyttene velges normalt ionet med høyest intensitet. Eventuelt kan ionet med best spesifisitet velges som kvantifiseringsion, noe som ble gjort for oktopamin. Fragmentionet av oktopamin som hadde høyest intensitet kunne ikke benyttes til kvantifisering på grunn av en interferens i urinprøvene. Kvantifiseringsionene er vist i tabell 2.9. Analyttene kvantifiseres ved å sammenligne forholdet mellom analytt og intern standard med kalibreringskurven.

Tabell 2.9 Identifikasjonsioner, kvantifiseringsioner og retensjonstider for stoffene

Stoff	Identifikasjonsioner, kvantifiseringsion understreket	Retensjonstid (min)
Fenylefrin	<u>116</u> , 267, 368	7,4
Norfenefrin	<u>102</u> , 267, 354	6,9
Oktopamin	102, <u>267</u> , 354	7,3
Synefrin	<u>116</u> , 267, 368	7,8

De ulike ionene kan forklares ut ifra strukturen til derivatene av analyttene. Disse er vist i figur 2.3.

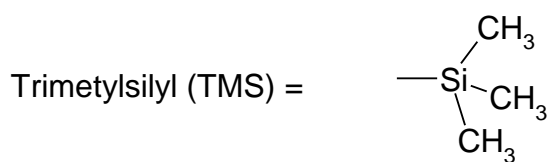
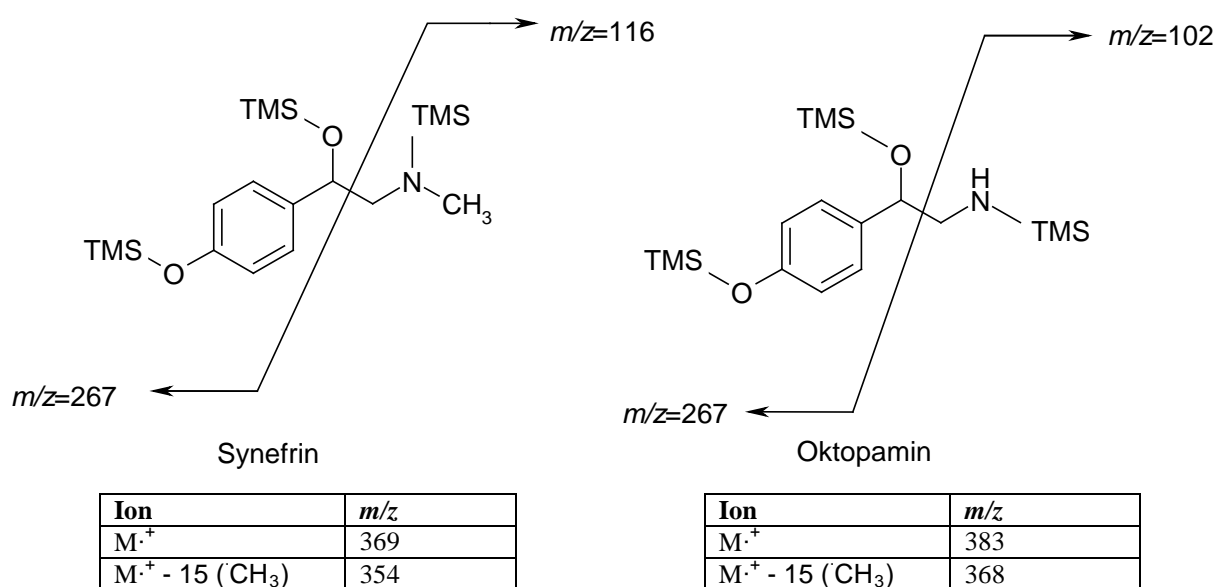


Fig 2.3 Struktur av derivatene med tilordning av observerte ioner

2.8 Prosedyre for validering

Ved validering av en analysemetode dokumenteres det at metoden er egnet for det formålet den skal benyttes til. Valideringen utføres ved å kartlegge metodens egenskaper gjennom testing av ulike parametre, og metoden bør tilfredsstillende forhåndsbestemte kriterier. (43) Testene som utføres er spesifisitet/selektivitet, linearitet, presisjon, nøyaktighet, gjenvinning (recovery), overdraging (carry-over), kvantifiseringsgrense (LOQ) og deteksjonsgrense (LOD).

Valideringsprosedyren som ble benyttet er en etablert valideringsprosedyre ved Norges laboratorium for dopinganalyse, og den er utarbeidet etter retningslinjer fra WADA og i henhold til internasjonale kvalitetsstandarder. Valideringen foregikk over 3 dager, og variasjon innen hver dag (intra-assay) og variasjon mellom dager (inter-assay) ble bestemt.

2.8.1 Selektivitet/spesifisitet

Selektivitet/spesifisitet beskriver metodens evne til å bestemme aktuell analytt uten interferens fra andre komponenter som kan forventes å være tilstede i prøven, deriblant stoffer med nært beslektede strukturer. (43)

Testen utføres ved å analysere 5 ulike blankprøver og demonstrere fravær av interfererende forbindelser, både med hensyn på aktuelle analytter og deres internstandarder.

2.8.2 Linearitet

Linearitet beskriver området der metoden gir en detektorrespons som er proporsjonal med konsentrasjon av analytt i prøven. Metodens evne til å gi lineære standardkurver beregnes ut ifra regresjonslinjen $y=ax+b$, der y representerer detektorrespons, x representerer konsentrasjon av analytt i prøven, a representerer kurvens stigningstall og b representerer kurvens skjæringspunkt med y -aksen. Regresjonskoeffisienten, r , uttrykker hvor godt linjen samsvarer med punktene, og bør ideelt ha en verdi på 0,999 eller bedre. (43)

Lineariteten bestemmes ved å etablere en standardkurve med 5 punkter som dekker hele konsentrasjonsområdet analyttene forventes å befinne seg i. Tabell 2.10 viser tillaging og sluttkonsentrasjon av standardprøvene for både synefrin og oktopamin.

Tabell 2.10 Konsentrasjon av standardprøvene brukt i standardkurvene

Sluttkonsentrasjon ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Bruksløsning ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Uttaksvolum (μl)
0,1	5	40
0,5	5	200
1,0	10	200
2,5	100	50
5,0	100	100

2.8.3 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon sier noe om spredning i analyseresultatene og blir vanligvis oppgitt som prosent relativt standardavvik, CV %. Lavt standardavvik indikerer god presisjon. (43)

Metodens nøyaktighet beskriver hvor nært sann verdi analyseresultatene ligger, og oppgis oftest som prosent avvik i forhold til den sanne verdien. Eventuelle systematiske feil i metoden vil gi utslag på nøyaktigheten. (43)

For å måle presisjon og nøyaktighet tillages kontrollprøver med 3 forskjellige konsentrasjoner (lav, middels og høy). Konsentrasjonene er oppgitt i tabell 2.11. For å måle intra-assay presisjon og nøyaktighet analyseres på dag 1 fem paralleller av hver konsentrasjon som sammenlignes med hverandre. Inter-assay presisjon og nøyaktighet blir målt ved å analysere fem paralleller av hver konsentrasjon også på dag 2 og 3, og så sammenligne resultatene fra alle dagene.

Tabell 2.11 Konsentrasjon i kontrollprøver

Stoff	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)		
	Lav konsentrasjon LC	Middels konsentrasjon MC	Høy konsentrasjon HC
Oktopamin	0,5	2	4
Synefrin	0,5	2	4

Instrumentpresisjon ble målt ved å injisere fem ganger fra samme kontrollprøve for hver av de 3 konsentrasjonene.

2.8.4 Gjenvinning (recovery)

Gjenvinning (recovery) beskriver prosentvis hvor mye av analytten som går tapt under opparbeidelse av prøven.

Gjenvinning måles ved at blankprøver opparbeides på samme måte som kontrollprøvene og tilsettes samme mengde standard som kontrollprøvene før siste inndamping etter at selve ekstraksjonen er ferdig. Resultatet fra disse prøvene regnes som 100 % og sammenlignes med kontrollprøvene der analytt og internstandard blir tilsatt før opparbeidelsen. Tap av analytt underveis i opparbeidelsen kan da beregnes.

2.8.5 LOD og LOQ

Deteksjonsgrensen (Limit of detection, LOD) er den laveste konsentrasjon av analytt som analysemetoden med sikkerhet kan detektere.

Kvantifiseringsgrensen (Limit of quantification, LOQ) er den laveste konsentrasjon av analytt som analysemetoden kan kvantifisere med akseptabel presisjon.

LOD og LOQ estimeres kromatografisk ved å måle støyen ved grunnlinjen og beregne den teoretiske konsentrasjonen av en prøve som gir et signal-støy-forhold på henholdsvis 3:1 og 10:1. (43) Teoretisk LOD og LOQ estimeres her ut ifra et gjennomsnitt av standardavvikene til kontrollene med lavest konsentrasjon.

3 Resultater

3.1 Forforsøk

Analyse av kosttilskuddspreparater

Kosttilskuddspreparatene som ble benyttet under utskillelsesforsøket ble analysert for innhold av virkestoff, og resultatet ble sammenlignet med mengden virkestoff som var deklart på pakningen. 3 paralleller av hvert preparat ble analysert, og gjennomsnittlig innhold ble beregnet. Resultatene er vist i tabell 3.1.

Tabell 3.1 Innhold av virkestoff i kosttilskuddspreparatene.

Preparatnavn	Virkestoff iht. deklarasjon	Parallell	Innhold (mg)	Gjennomsnittlig innhold (mg)	% av deklart mengde
Synephrine "Top Formula"	<i>Citrus aurantium</i>	1	102,8	105,0	105
	tilsvarende	2	101,4		
	100 mg synefrin	3	110,8		
Beta 3 Metabolic Optimizer "Syntrax"	Oktopamin, 500 mg	1	503,8	453,1	90,6
		2	402,0		
		3	453,6		

Analyse av næringsmidler

Et utvalg av ulike næringsmidler ble undersøkt for innhold av synefrin og oktopamin. Innhold av analytt per milliliter eller per gram næringsmiddel ble beregnet. Resultatene er vist i tabell 3.2.

Tabell 3.2 Innhold av synefrin og oktopamin i et utvalg næringsmidler.

Næringsmiddel	Innhold synefrin	Innhold oktopamin
Lerums utvalde appelsinjus (ikke fra konsentrat)	0,39 mg/ml	Ikke påvist
Nora 100% naturlig Appelsinjuice (fra konsentrat)	0,40 mg/ml	Ikke påvist
First Price Appelsinjuice (fra konsentrat)	0,39 mg/ml	Ikke påvist
Noras hjemmelagede appelsinmarmelade	0,29 mg/g	Ikke påvist
Fru Bennett's Bitter Appelsin Marmelade	0,30 mg/g	Ikke påvist
Pomeransskall malt	0,39 mg/g	Ikke påvist
Blue Dragon Soyasaus	Ikke påvist	Ikke påvist
Freia Regia Bakekakao pulver	Ikke påvist	Ikke påvist

Metoden brukt til analysen er ikke validert, men ut ifra vurdering av signal-støy-forhold er LOQ for både synefrin og oktopamin estimert til ca 0,1 mg/ml for væsker, og 0,1 mg/g for faste stoffer.

Ut ifra resultatene fra analysen av næringsmidler ble det bestemt å utføre utskillelsesforsøk etter inntak av appelsinmarmelade laget av bitterappelsiner. Dette ble valgt siden studier har vist at *Citrus aurantium* generelt inneholder høye konsentrasjoner av synefrin, og siden marmeladen også inneholder biter av appelsinskall der innholdet av synefrin er vist å være høyt.

Økt utbytte av væske-væske-ekstraksjon

For å se på mulighetene for å øke utbyttet av væske-væske-ekstraksjonen ble inndamping av standard og økt mengde organisk fase testet ut og sammenlignet. Resultatene er vist i figur 3.1 og 3.2.

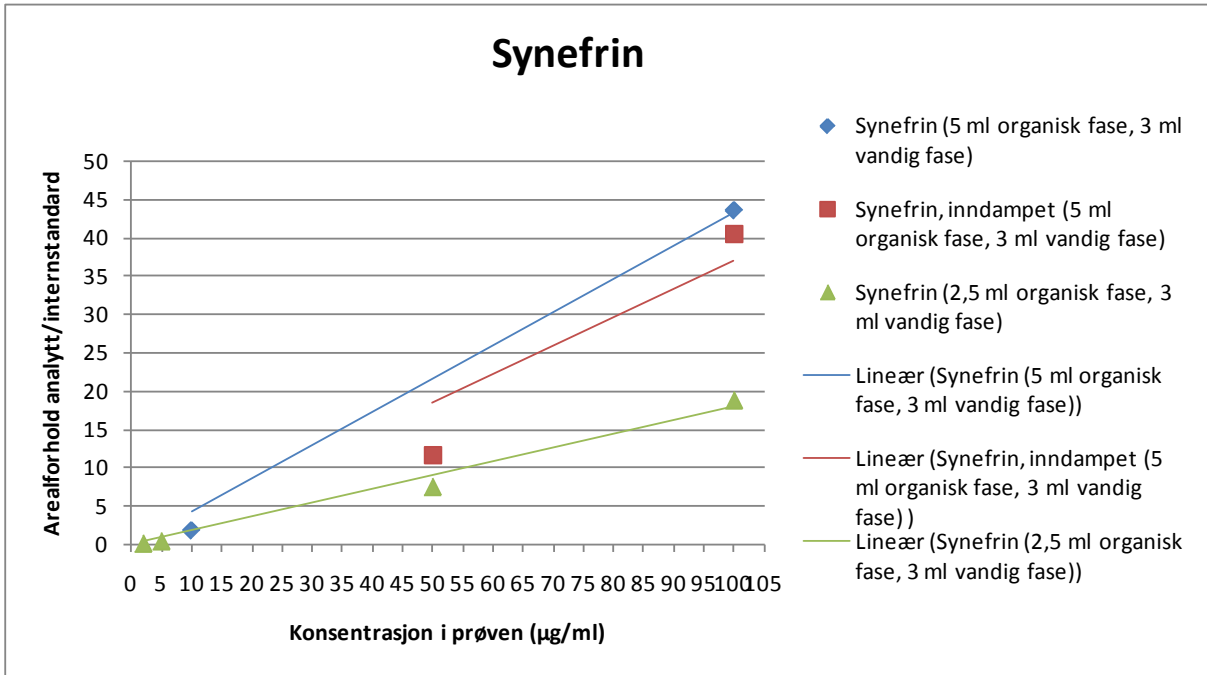


Fig. 3.1 Utbytte av synefrin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon etter inndamping av standard og med økt mengde organisk fase.

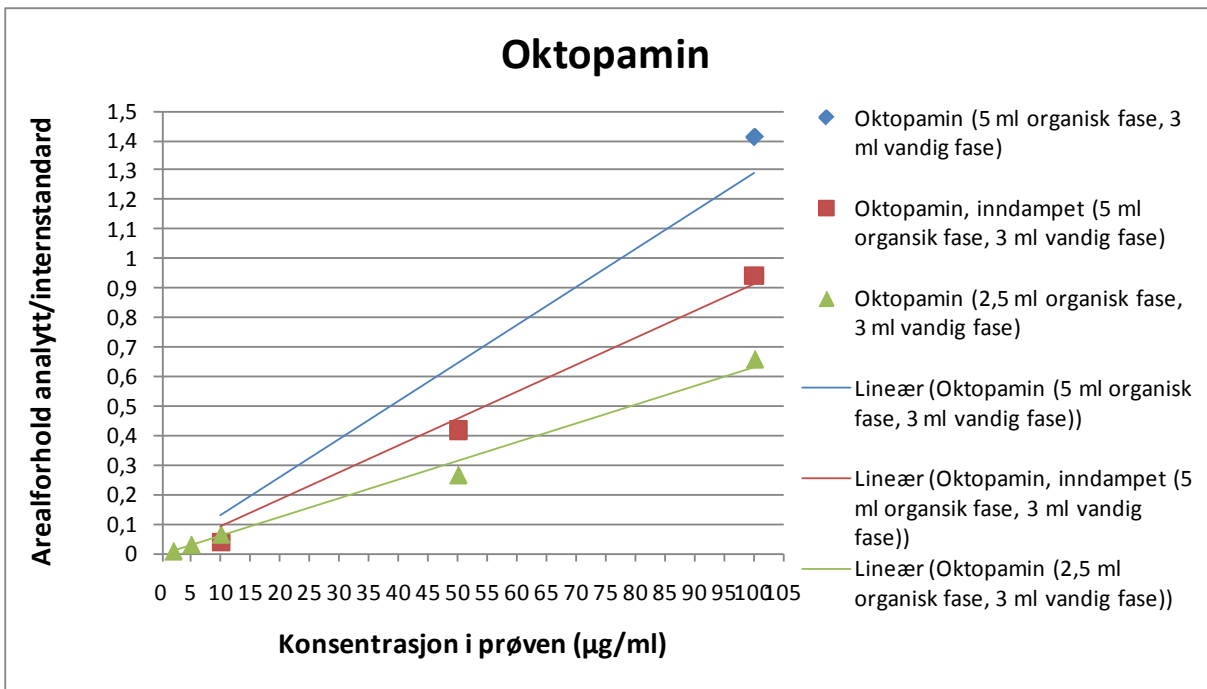


Fig. 3.2 Utbytte av oktopamin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon etter inndamping av standard og med økt mengde organisk fase.

Utskillelsesforsøk

Hensikten med utskillelsesforsøket var å innhente grunnleggende informasjon om utskillelsesprofilen til stoffene. Det var ønskelig å se hvor lenge man måtte samle urin etter administrasjon av preparat før konsentrasjonsnivået var tilbake til utgangspunktet, og å få et bilde av hvilke konsentrasjoner man kan forvente å finne i urinprøvene slik at området for kalibreringskurven kunne defineres. For alle urinprøvene ble totalvolum av fraksjonen registrert, og pH og spesifikk vekt ble målt. Verdiene er listet opp i tabell 3.3 og 3.4.

Tabell 3.3 Etter administrasjon av oktopamin kapsel

Urinprøvetidspunkt	Urinvolum (ml)	Spesifikk vekt (g/ml)	pH
0 timer (spot)	27,5	1,016	6,4
0-2 timer	350	1,012	6,3
2-4 timer	150	1,017	5,7
4-6 timer	75	1,018	5,7
6-9 timer	150	1,019	6,0
9-14 timer	225	1,017	6,0
14-24 timer	575	1,013	6,2
48 timer (spot)	35	1,020	6,3

Tabell 3.4 Etter administrasjon av synefrin tablett

Urinprøvetidspunkt	Urinvolum (ml)	Spesifikk vekt (g/ml)	pH
0 timer (spot)	37,5	1,024	6,1
0-2 timer	300	1,015	6,1
2-4 timer	150	1,017	5,6
4-6 timer	125	1,017	5,8
6-9 timer	300	1,011	6,6
9-14 timer	225	1,019	6,3
14-24 timer	525	1,016	5,7
48 timer (spot)	42,5	1,016	6,4

Prøvene ble opparbeidet ved å benytte væske-væske-ekstraksjonsmetoden.

Utskillelseshastighet og konsentrasjon i prøvene ble beregnet for begge analyttene.

Konsentrasjonen av analytt i fraksjonen, korrigert for spesifikk vekt, ble plottet mot tiden etter

inntak, og utskilleleshastigheten ble plottet mot tiden etter inntak. Figur 3.3 og 3.4 viser gjennomsnittlig konsentrasjonen av synefrin og oktopamin i fraksjonen, korrigert for spesifikt vekt, plottet mot tiden etter inntak.

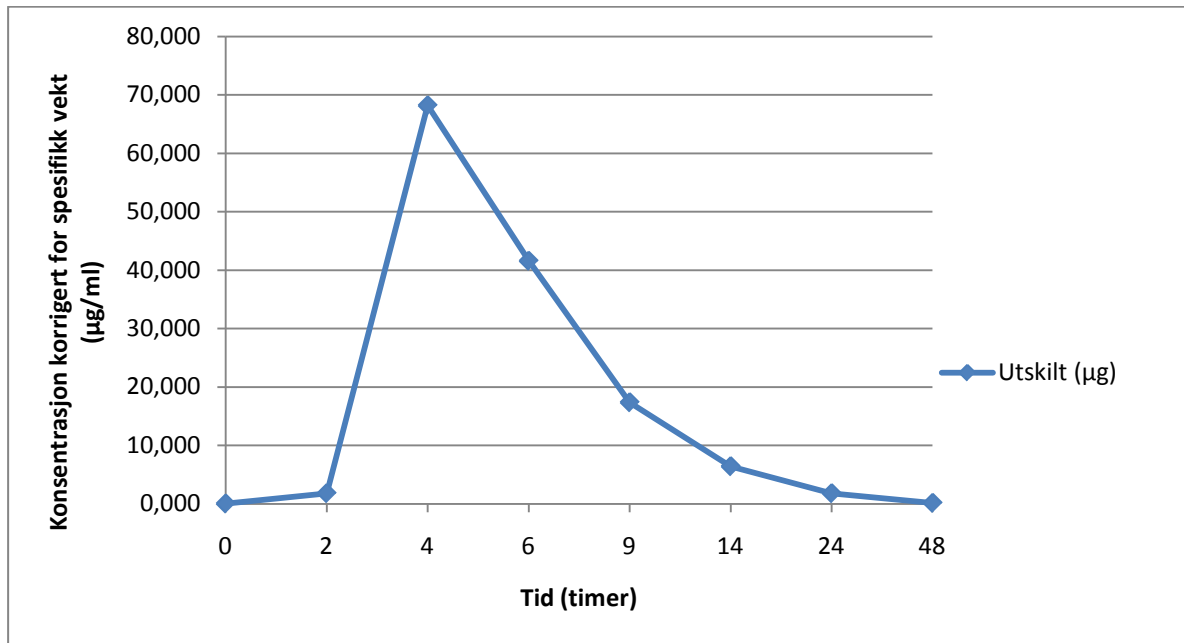


Fig 3.3 Konsentrasjon av synefrin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon.

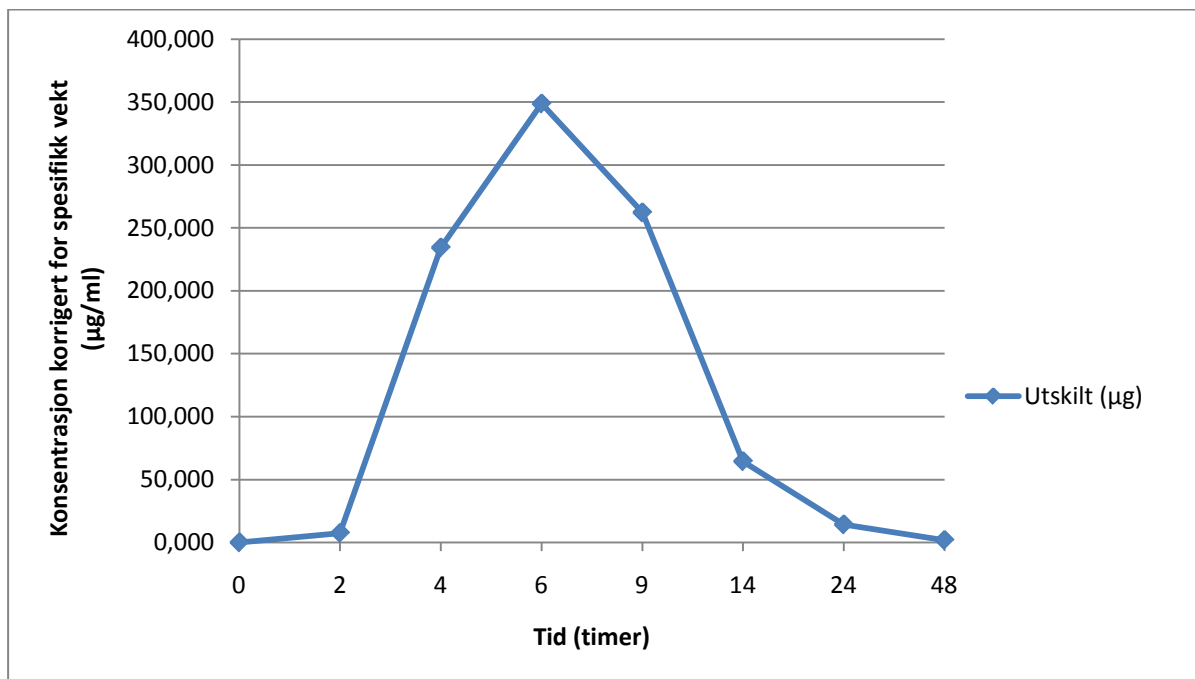


Fig 3.4 Konsentrasjon av oktopamin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon.

Figur 3.5 og 3.6 viser gjennomsnittlig utskillelshastighet av synefrin og oktopamin beregnet for fraksjonen, plottet mot tiden etter inntak.

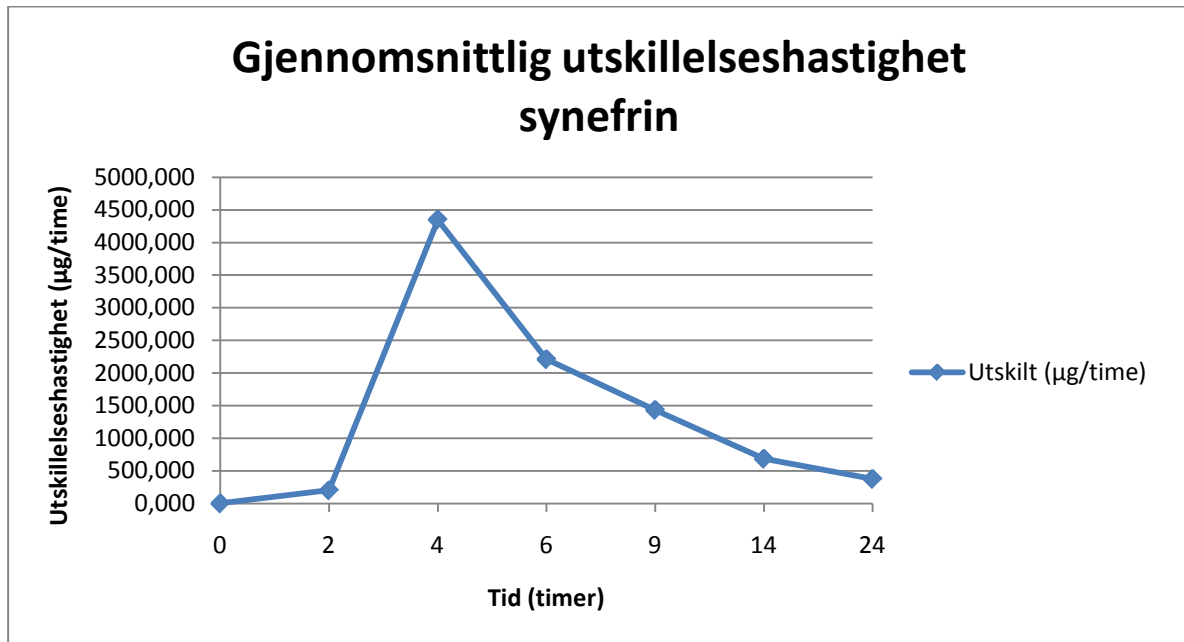


Fig 3.5 Utskillelshastighet av synefrin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon.

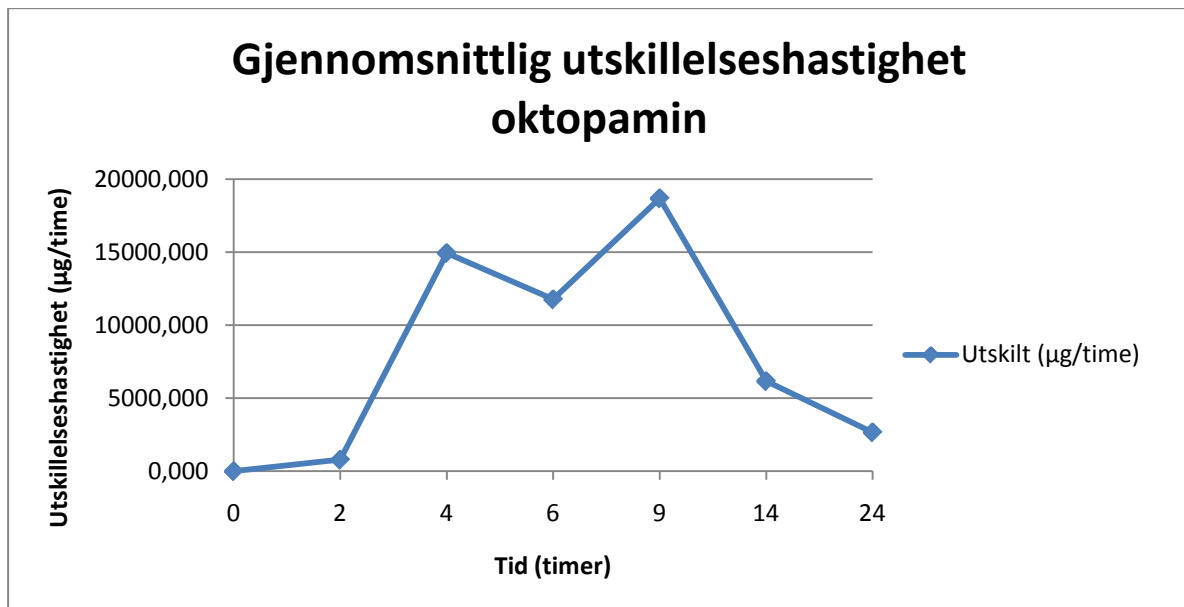


Fig 3.6 Utskillelshastighet av oktopamin etter opparbeidelse med væske-væske-ekstraksjon.

3.2 GC-MS-metoden

Ulike temperaturprogram ble testet ut for å få best mulig separasjon av synefrin og oktopamin med tilhørende internstandarder fenylefrin og norfenefrin. Starttemperaturen ble prøvd ut fra 100- 140 °C med både rask og langsom økning av temperaturen opp til 320 °C. En annen type kolonne ble også testet ut, men denne gav ikke bedre separasjon av stoffene. Best separasjon av stoffene ble oppnådd ved å øke temperaturen fra 120 °C med 10 °C i minuttet opp til 200 °C, og videre en rask økning av temperaturen til 320 °C. Dette temperaturprogrammet gav en akseptabel analysetid på 14 minutter. Separasjonen av stoffene ble ikke bedre ved å benytte en slakere temperaturgradient, og dette ville også gitt lengre analysetider. Siden analyttene er små polare molekyler ville en raskere økning av temperaturen ført til at stoffene ble eluert etter noen få minutter, og man ville fått større problemer med interferens fra andre stoffer i urinprøvene.

Synefrin og norfenefrin ble fullstendig separert, mens fenylefrin og oktopamin ikke ble fullstendig grunnlinjeseparert. Det ble allikevel vurdert at den lille overlappingen i kromatogrammet mellom fenylefrin og oktopamin ikke hadde signifikant betydning for kvantifiseringen av analyttene. Det er fordi de fragmenterer ulikt, og fenylefrin er den interne standarden til synefrin, ikke oktopamin.

3.3 Validering

Urinprøver er generelt rike på biogene stoffer med lignende egenskaper og struktur som synefrin, fenylefrin, norfenefrin og oktopamin. Disse stoffene vil kunne interferere med analyttene og de interne standardene. For oktopamin ble det avdekket en interferens ved fragmentet med $m/z = 102$. Blankprøvene som ble analysert på dag 1 viste ingen andre interferenser av betydning for synefrin, fenylefrin og norfenefrin. Ved å velge kvantifiseringsion $m/z = 267$ for oktopamin unngår man problemet med interferensen.

Overdragelse (carry-over) beskriver mengden analytt som blir dratt med i analyseinstrumentet fra en prøve til en annen. Den ble målt på dag 1 ved at en blankprøve ble injisert etter hver kontrollprøve med høy konsentrasjon (HC). Det ble ikke sett signifikante utslag i kromatogrammene til blankprøvene som skulle indikere at overdraging i analysesystemet er noe problem ved analysemetoden.

3.3.1 Linearitet

Standardkurven for analyttene bør ideelt sett ha en korrelasjonskoeffisient på 0,999. (46) Norges laboratorium for dopinganalyse har satt minstekravet for linearitet til $r^2 > 0,985$ for å kunne avgjøre om korrelasjonen er akseptabel. Tabell 3.5 viser oppnådde korrelasjonskoeffisienter for stoffene under valideringen.

Tabell 3.5 Korrelasjonskoeffisient til stoffene

Stoff		Korrelasjonskoeffisient, r^2
Oktopamin	Dag 1	0,9968
	Dag 2	0,9935
	Dag 3	0,9870
	Snitt	0,9924
Synefrin	Dag 1	0,9667
	Dag 2	0,9810
	Dag 3	0,9880
	Snitt	0,9786

3.3.2 Presisjon og nøyaktighet

Intra-assay og inter-assay presisjon og nøyaktighet ble beregnet under valideringen. Intra-assay estimerer presisjon og nøyaktighet innenfor en av valideringsdagene, mens inter-assay estimerer presisjon og nøyaktighet for alle valideringsdagene.

Presisjon oppgis som relativt standardavvik (CV %) og nøyaktighet oppgis som prosent avvik fra sann verdi.

Kravet for godkjenning av presisjon avhenger av hvilket konsentrasjonsområde vi analyserer i. Generelt kan man tillate et større relativt standardavvik ved lave konsentrasjoner (ng/ml) enn man bør akseptere ved høye konsentrasjoner ($\mu\text{g/ml}$). Nøyaktigheten bør ikke overskride 25 % relativt avvik. Tabell 3.6 viser resultatene fra valideringen.

Tabell 3.6 Intra- og inter-assay presisjon og nøyaktighet oppnådd for stoffene i valideringen

Stoff	Konsentrasjon (µg/ml)	Intra-assay		n	Inter-assay		n
		Presisjon (CV %)	Nøyaktighet (%)		Presisjon (CV %)	Nøyaktighet (%)	
Oktopamin	0,5	1,92	-4,31	5	9,36	1,02	13
	2	7,29	-13,93	5	6,55	-16,12	15
	4	3,30	-2,24	5	7,15	-8,89	15
Synefrin	0,5	11,19	-21,92	5	18,34	-8,34	15
	2	17,42	-19,17	5	20,77	-5,82	15
	4	6,92	-14,36	5	15,90	3,49	15

Instrumentpresisjon ble også testet, og uttrykkes som relativt standardavvik. Tabell 3.7 viser resultatene fra valideringen.

Tabell 3.7 Instrumentpresisjon for analyttene

Stoff	Konsentrasjon (µg/ml)	Instrumentpresisjon (CV %)	n
Oktopamin	0,5	1,65	5
	2	0,51	5
	4	0,69	5
Synefrin	0,5	0,16	5
	2	0,69	5
	4	0,38	5

3.3.3 Gjenvinning (recovery)

Gjenvinning sier noe om hvor mye av analytten som går tapt under prøveopparbeidelsen, og ved Norges laboratorium for dopinganalyse er det fastsatt at beregnet utbyttet bør ligge mellom 80 og 120 %. Tabell 3.8 viser gjennomsnittlig gjenvinning beregnet for ulike konsentrasjoner av analyttene under valideringen.

Tabell 3.8 Gjenvinning av analytt under valideringen

Stoff	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Gjenvinning (%)
Oktopamin	0,5	62,7
Oktopamin	2	81,8
Oktopamin	4	83,2
Synefrin	0,5	89,8
Synefrin	2	84,4
Synefrin	4	85,8

3.3.4 LOD og LOQ

LOD beregnes som 3 ganger standardavviket til kontrollprøvene med lavest konsentrasjon, og LOQ beregnes som 10 ganger standardavviket til kontrollprøvene med lavest konsentrasjon.

Tabell 3.9 viser resultatene fra valideringen.

Tabell 3.9 LOD og LOQ for analyttene

Stoff	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Oktopamin	0,03	0,09
Synefrin	0,1	0,4

3.4 Hovedforsøket

Hensikten med hovedforsøket var å danne et bilde av utskillelsesprofilen til synefrin og oktopamin i urin etter inntak av ulike kosttilskuddspreparater og næringsmidler. Man ønsket også å se på mulighetene for å etablere grenseverdier for synefrin og oktopamin i urin som kunne skille mellom naturlig utskillelse av stoffene og utskillelse etter inntak av kosttilskuddsprodukter. Det var også ønskelig å se på hvordan inntak av vanlige næringsmidler med innhold av synefrin påvirket utskillelsen av synefrin i urin hos forsøkspersonene.

3.4.1 Fremstilling av resultatene fra prøvene

Etter administrasjon av preparatene ble all urin samlet i 24 timer. En spotprøve ble avlagt før inntak av preparat, og ved 48 og 72 timer etter inntak. Spotprøven er kun en liten del av urinmengden på det gitte tidspunktet. For alle urinprøvene ble totalvolum av fraksjonen registrert, og pH og spesifikk vekt ble målt. Konsentrasjon av analytt i $\mu\text{g/ml}$ ble beregnet i prøvene, og denne konsentrasjonen ble korrigert med hensyn på prøvens spesifikke vekt. Det beregnes bare utskilleleshastighet for de første 24 timene da dette er den tiden man har kontroll på hele urinvolumet. Utskilleleshastigheten ble plottet mot tiden etter inntak av preparat, og konsentrasjon av analytt korrigert for spesifikk vekt ble også plottet mot tiden etter inntak. Siden antallet forsøkspersoner er begrenset, er resultatene fra hvert forsøk plottet individuelt.

3.4.2 Synefrin

Hver forsøksperson inntok en tablett Synephrine "Top Formula" med oppgitt innhold av *Citrus aurantium* tilsvarende 100 mg synefrin.

Konsentrasjon korrigert for spesifikk vekt

Figur 3.7 – 3.9 viser konsentrasjon av synefrin i prøvene korrigert for spesifikk vekt for de tre forsøkspersonene.

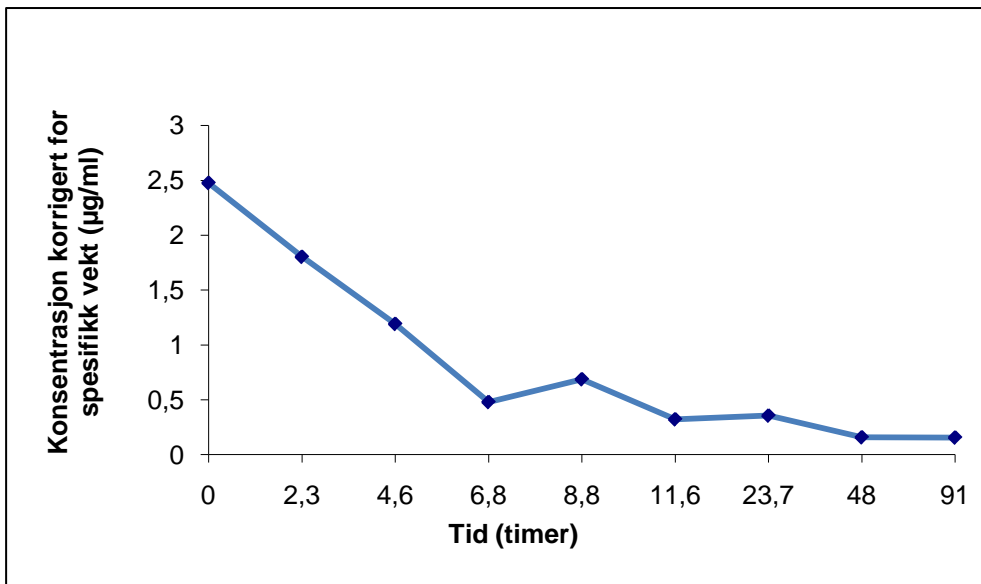


Fig. 3.7 Konsentrasjon av synepfrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 1

Etter 24 timer er 0,9 mg utskilt, noe som tilsvarer 0,9 % av inntatt mengde.

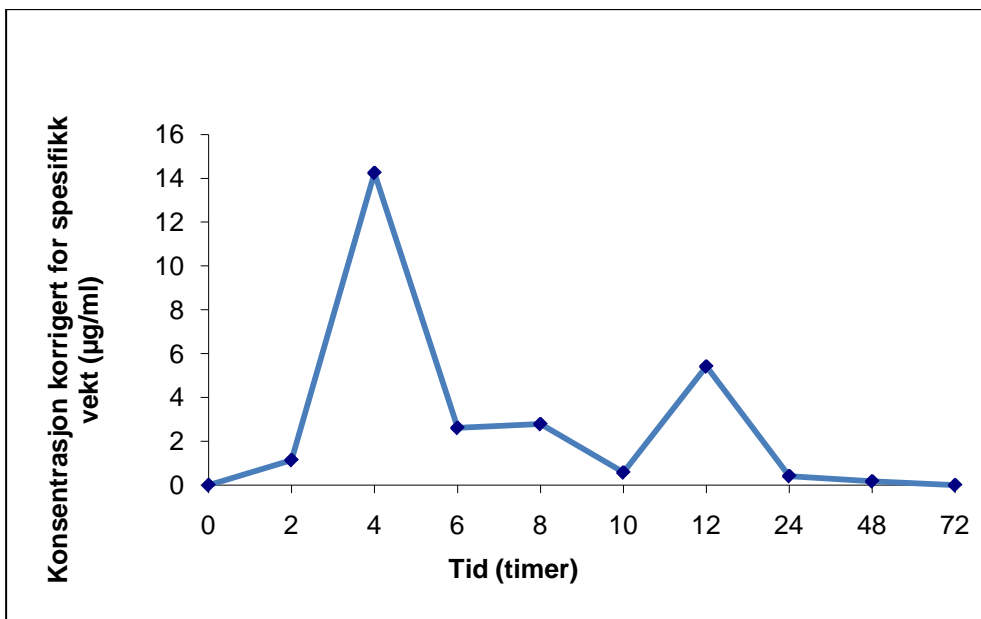


Fig. 3.8 Konsentrasjon av synepfrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 2

Etter 24 timer er 3,2 mg utskilt, noe som tilsvarer 3,2 % av inntatt mengde.

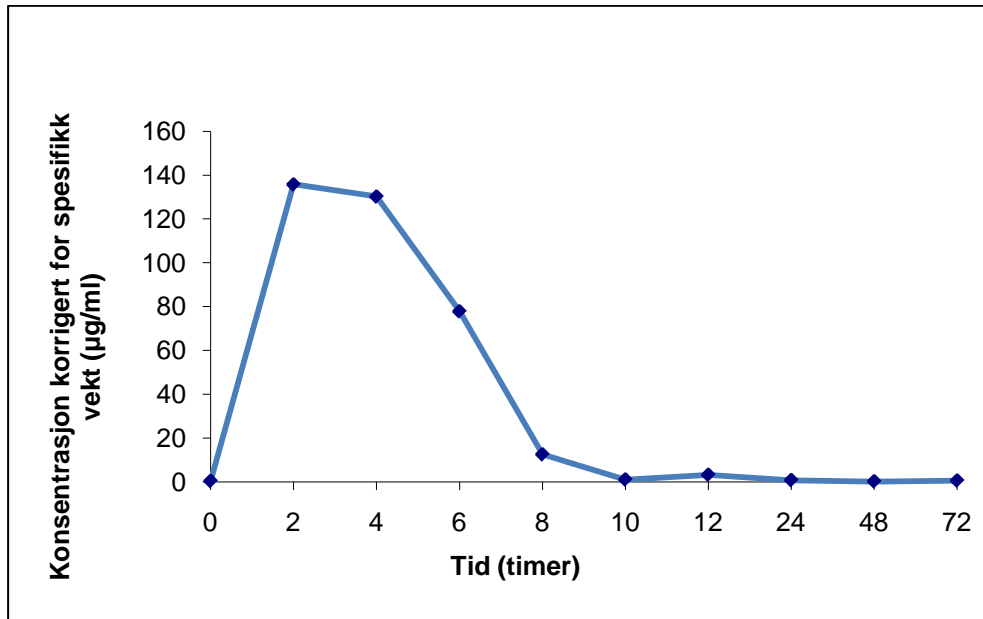


Fig. 3.9 Konsentrasjon av synepfrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 3

Etter 24 timer er 50,6 mg utskilt, noe som tilsvarer 50,6 % av inntatt mengde.

Utskillelshastighet

Figur 3.10 – 3.12 viser utskillelshastighet av synepfrin for de tre forsøkspersonene.

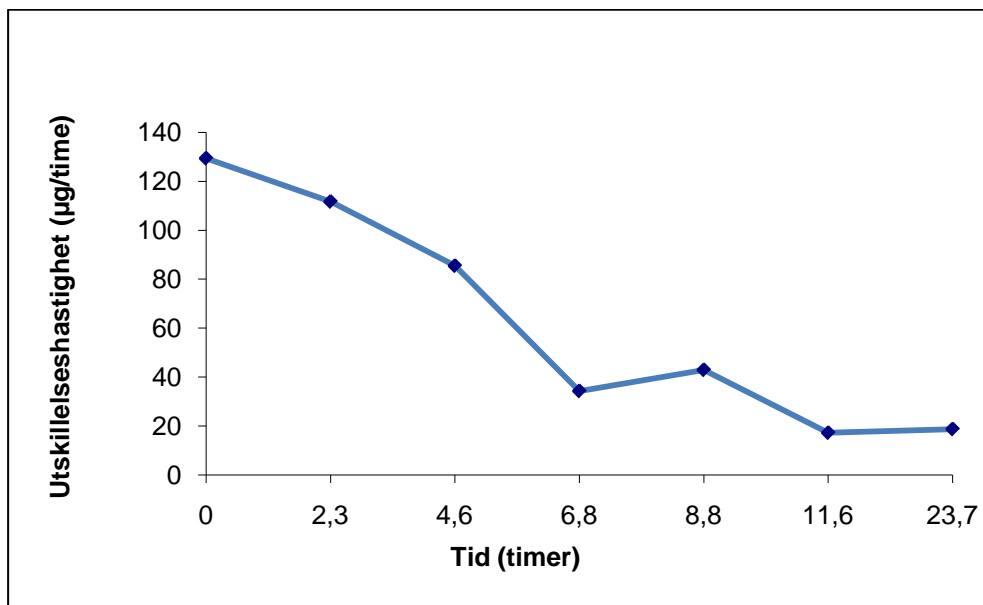


Fig. 3.10 Utskillelshastighet av synepfrin, forsøksperson 1

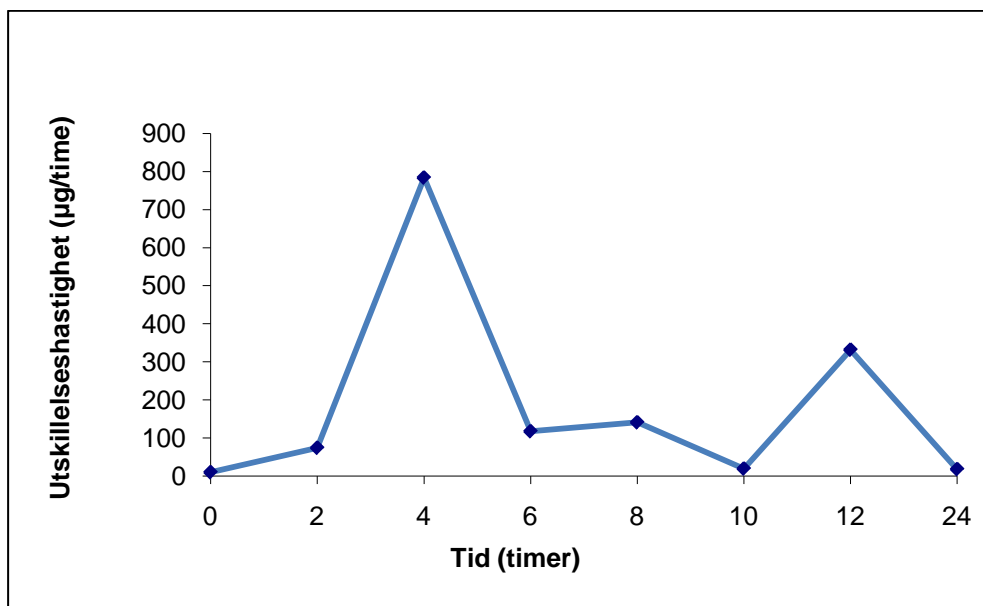


Fig. 3.11 Utskilleleshastighet av synepfrin, forsøksperson 2

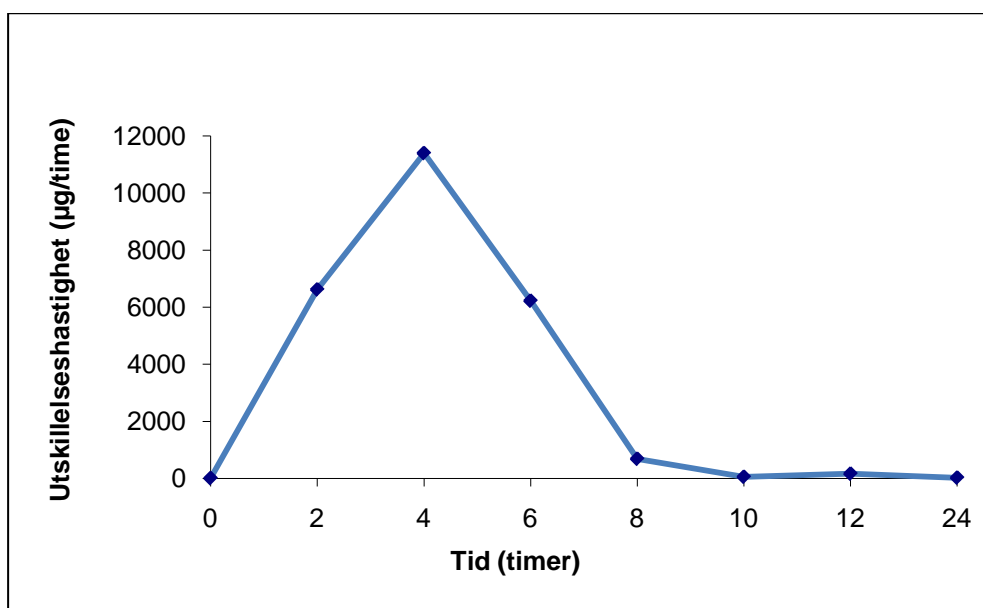


Fig. 3.12 Utskilleleshastighet av synepfrin, forsøksperson 3

3.4.3 Oktopamin

Hver person inntok en kapsel Beta 3 Metabolic Optimizer "Syntrax" oppgitt å inneholde 500 mg oktopamin.

Konsentrasjon korrigert for spesifikk vekt

Figur 3.13 – 3.15 viser konsentrasjon av synefrin i prøvene korrigert for spesifikk vekt for de tre forsøkspersonene.

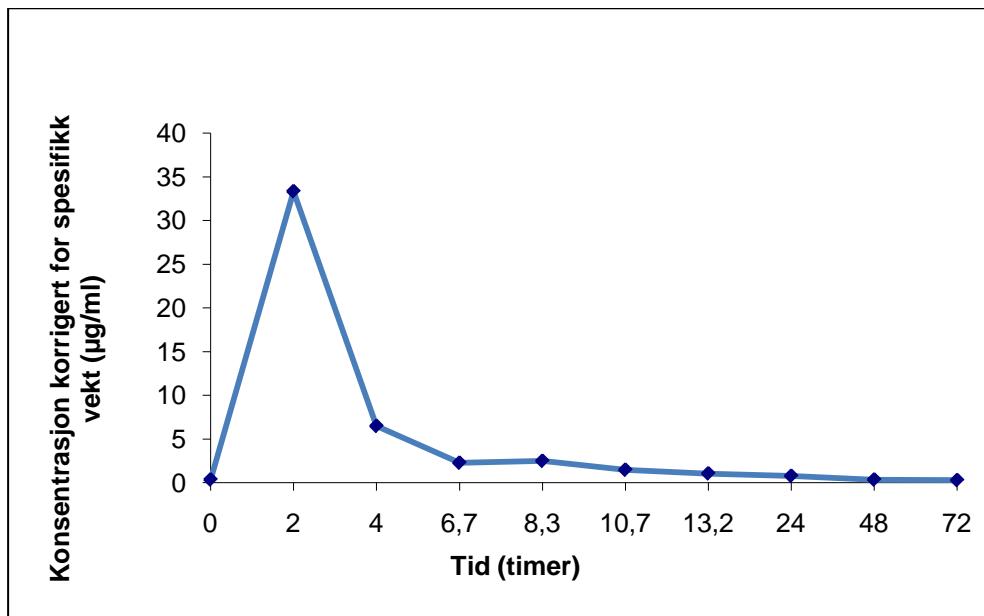


Fig. 3.13 Konsentrasjon av oktopamin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 1

Etter 24 timer er 1,9 mg utskilt, noe som tilsvarer 0,4 % av inntatt mengde.

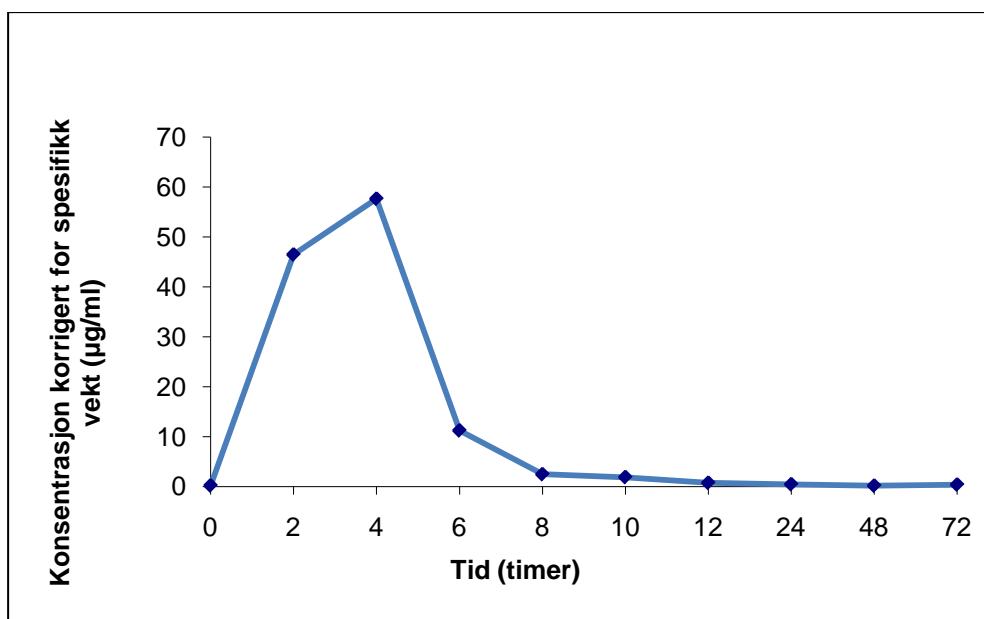


Fig. 3.14 Konsentrasjon av oktopamin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 2

Etter 24 timer er 15,3 mg utskilt, noe som tilsvarer 3,1 % av inntatt mengde.

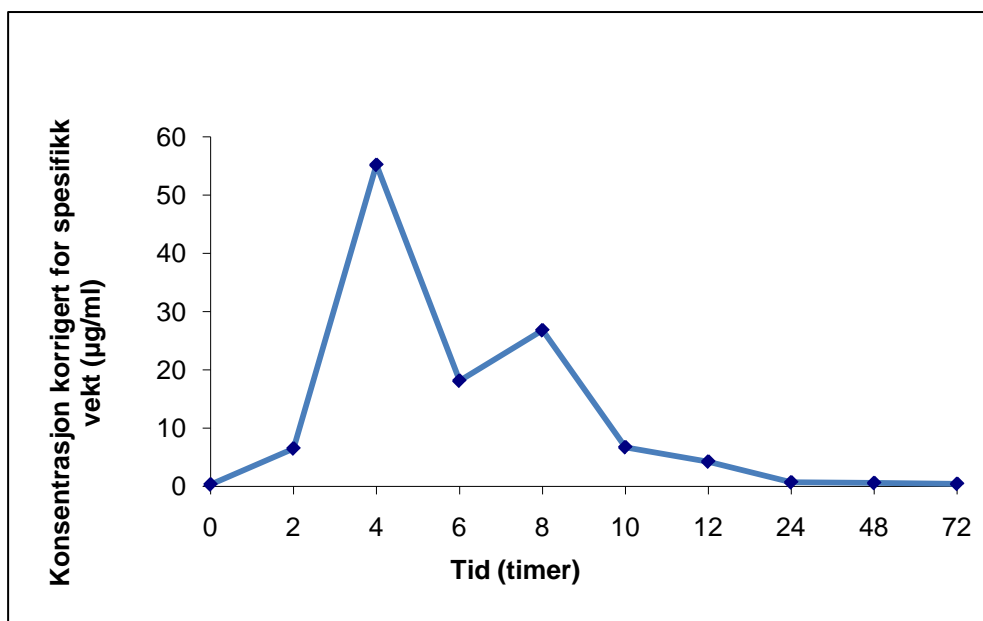


Fig. 3.15 Konsentrasjon av oktopamin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 3

Etter 24 timer er 18,0 mg utskilt, noe som tilsvarer 3,6 % av inntatt mengde.

Utskilleleshastighet

Figur 3.16 – 3.18 viser utskilleleshastighet av oktopamin for de tre forsøkspersonene.

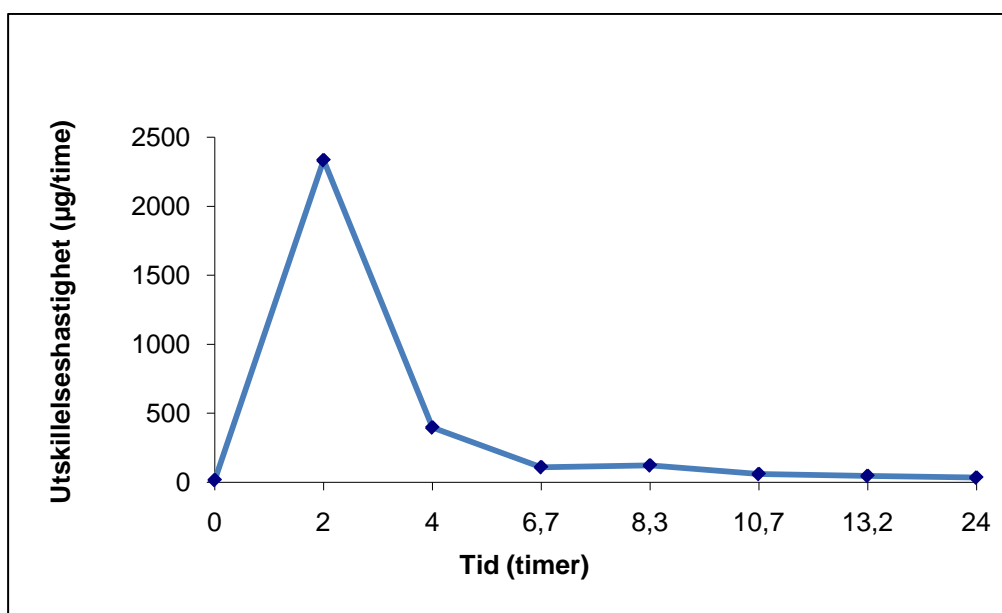


Fig. 3.16 Utskilleleshastighet av oktopamin, forsøksperson 1

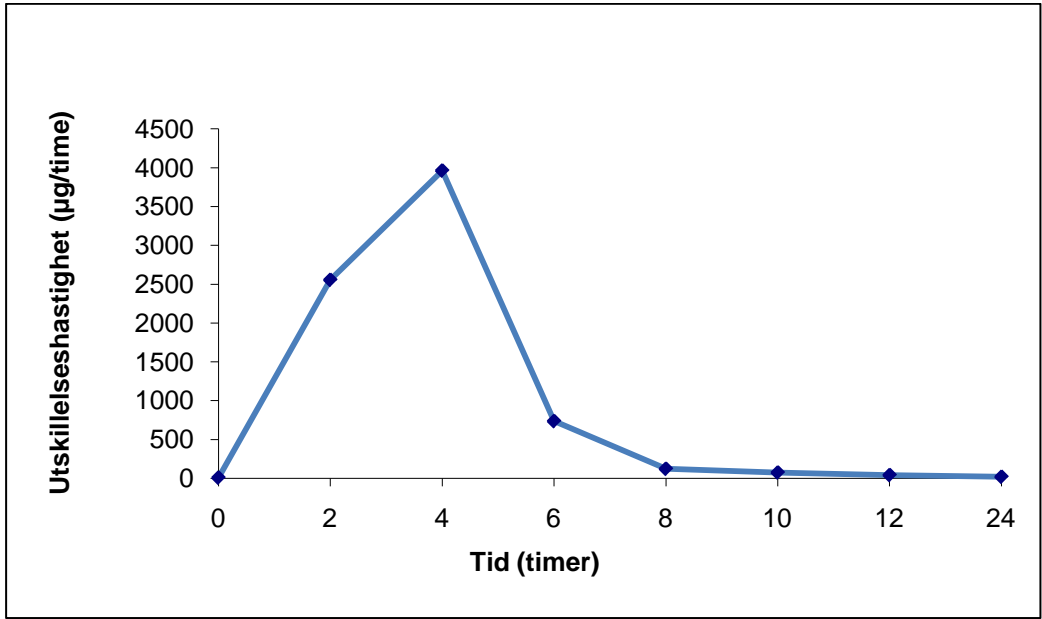


Fig. 3.17 Utskilleleshastighet av oktopamin, forsøksperson 2

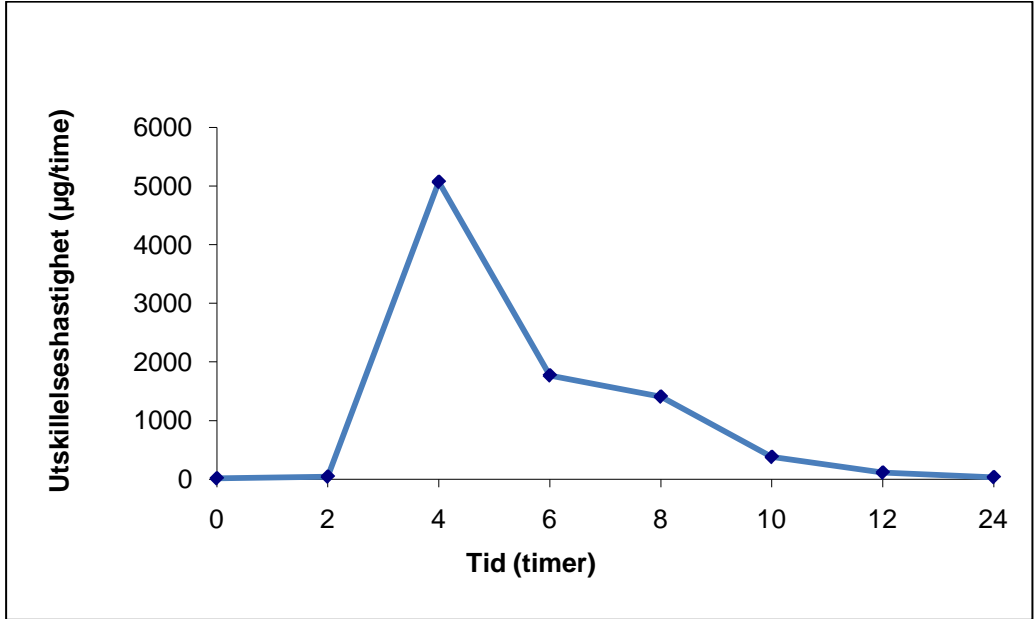


Fig. 3.18 Utskilleleshastighet av oktopamin, forsøksperson 3

3.4.4 Appelsinmarmelade

Hver person inntok 100 g appelsinmarmelade laget av bitterappelsin, som i forforsøket ble målt å inneholde i gjennomsnitt 0,3 mg/g synefrin, noe som tilsvarer 30 mg synefrin totalt.

Konsentrasjon korrigert for spesifikk vekt

Figur 3.19 – 3.21 viser konsentrasjon av synefrin i prøvene korrigert for spesifikk vekt for de tre forsøkspersonene.

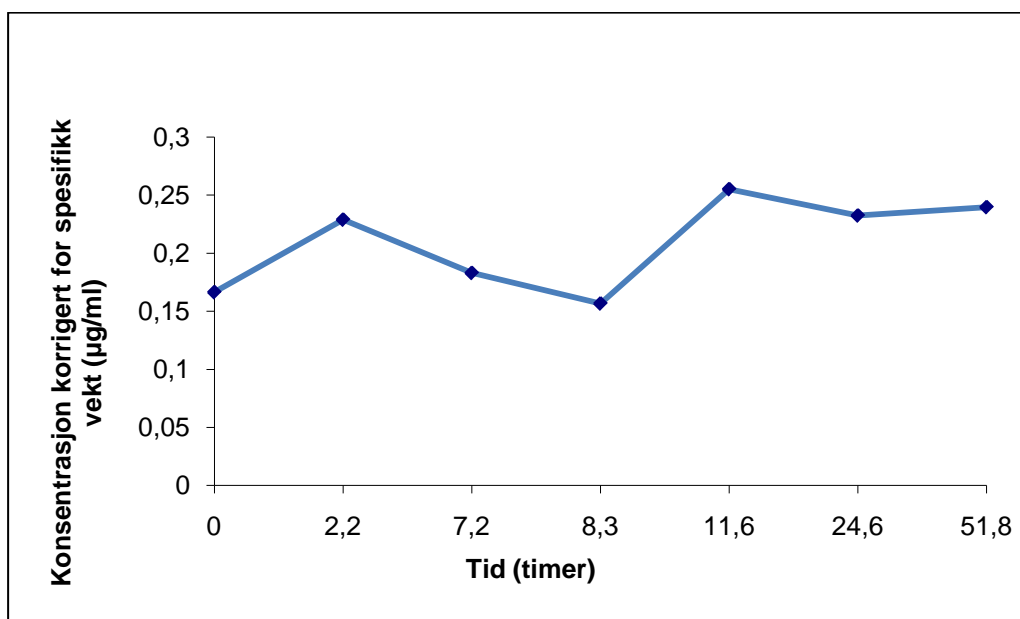


Fig. 3.19 Konsentrasjon av synefrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 1

Etter 24 timer er 0,3 mg utskilt, noe som tilsvarer 1 % av inntatt mengde.

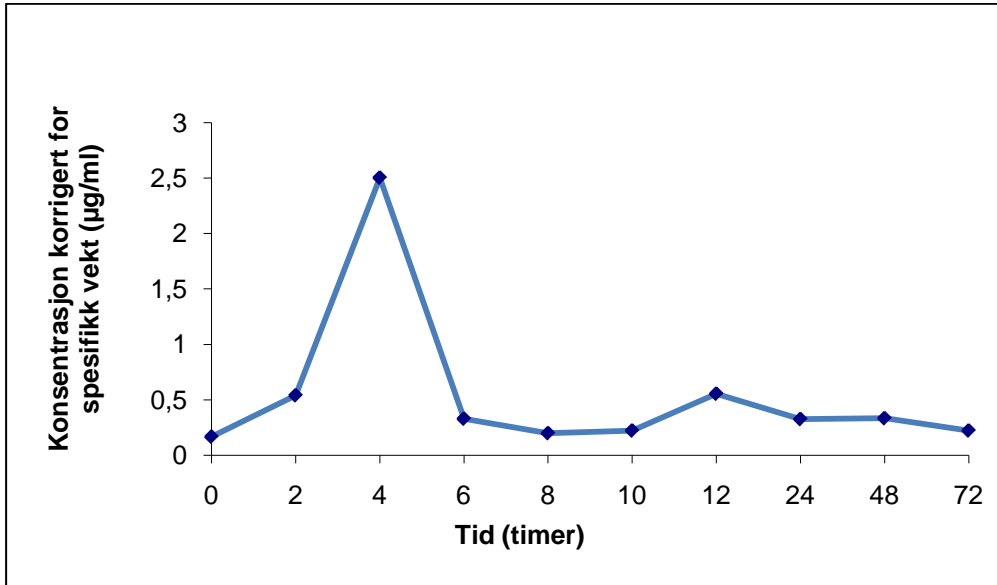


Fig. 3.20 Konsentrasjon av synepfrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 2

Etter 24 timer er 0,7 mg utskilt, noe som tilsvarer 2,4 % av inntatt mengde.

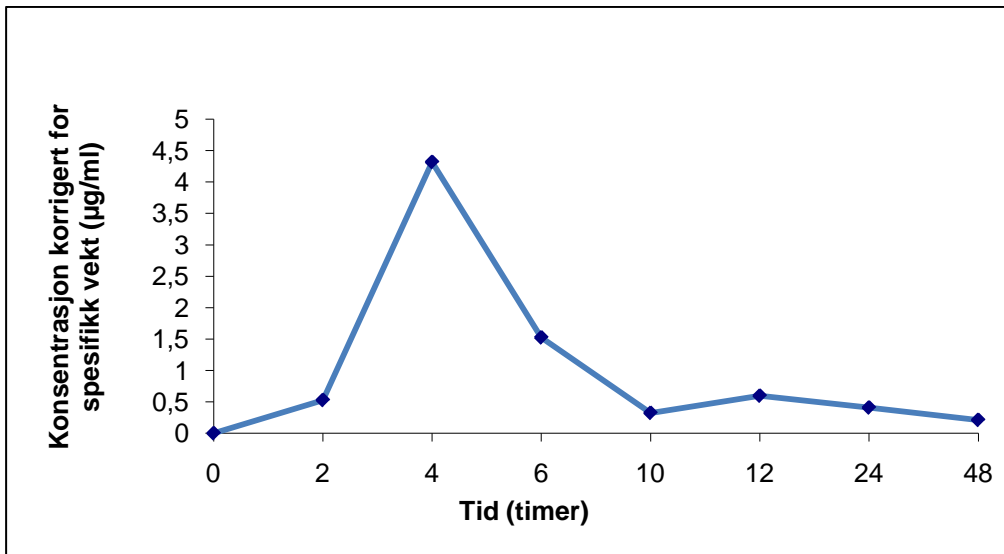


Fig. 3.21 Konsentrasjon av synepfrin korrigert for spesifikk vekt, forsøksperson 3

Etter 24 timer er 1,1 mg utskilt, noe som tilsvarer 3,5 % av inntatt mengde.

Utskilleleshastighet

Figur 3.22 – 3.24 viser utskilleleshastighet av synefrin for de tre forsøkspersonene.

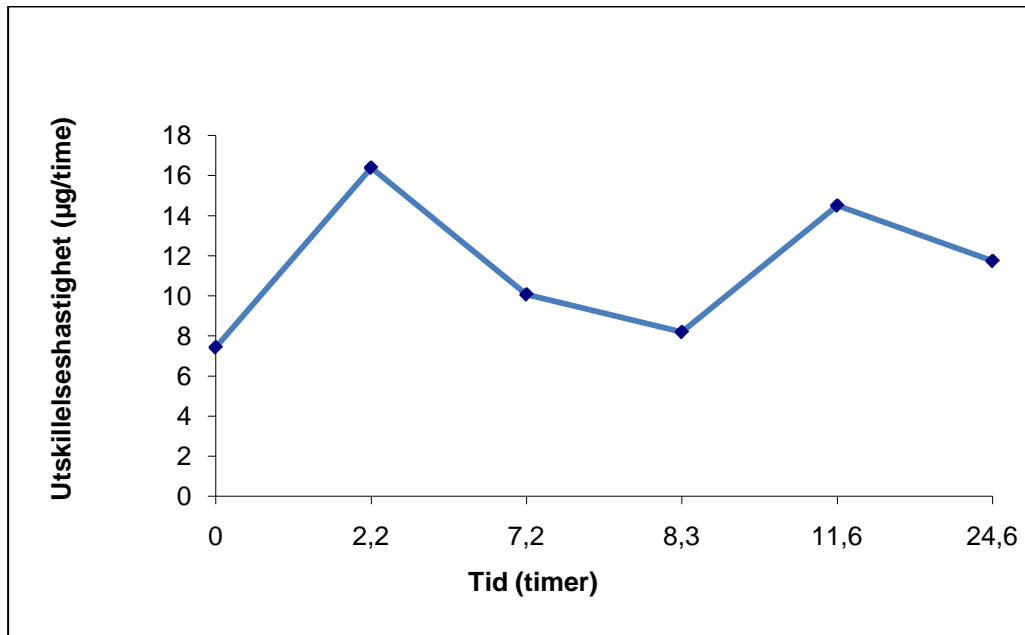


Fig. 3.22 Utskilleleshastighet av synefrin, forsøksperson 1

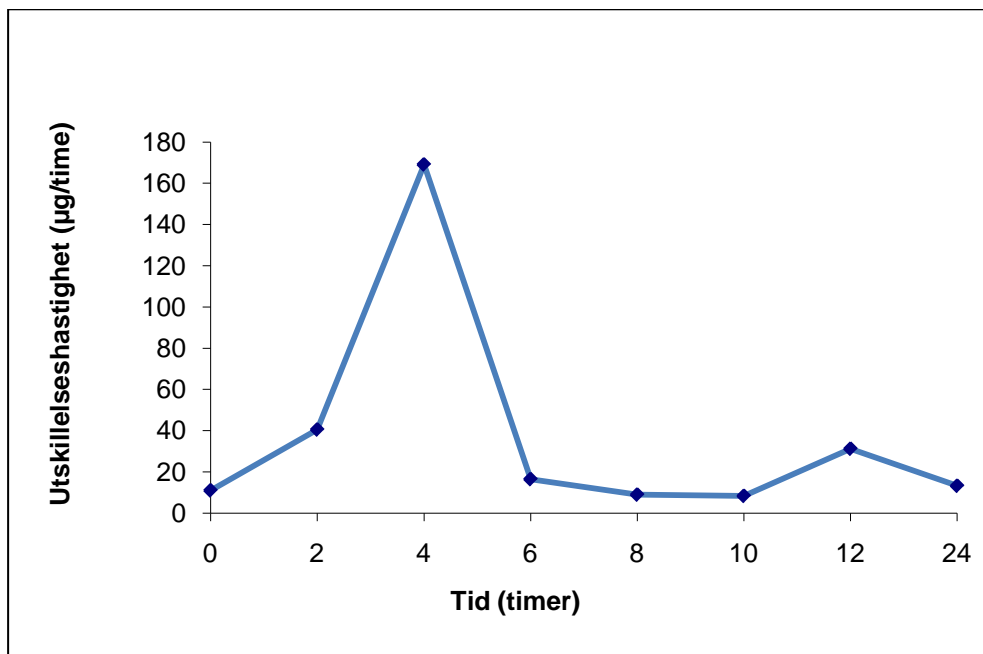


Fig. 3.23 Utskilleleshastighet av synefrin, forsøksperson 2

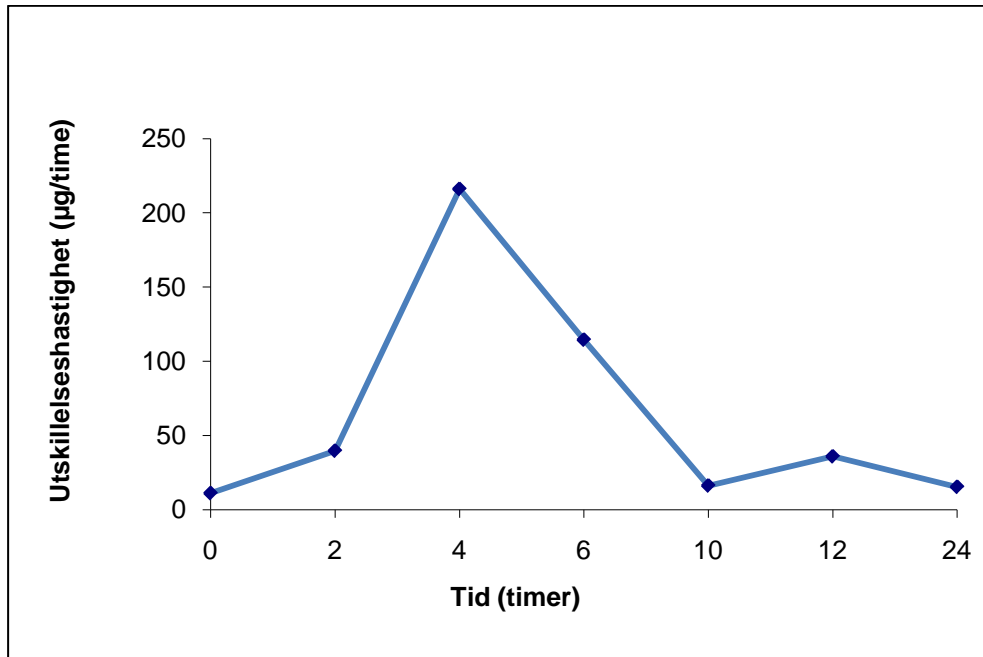


Fig. 3.24 Utskilleleshastighet av synepfrin, forsøksperson 3

4 Diskusjon

4.1 Forforsøk

Analyse av kosttilskuddspreparater

Resultatene av den kvantitative analysen viser samsvar mellom beregnet gjennomsnittlig konsentrasjon og oppgitt mengde av virkestoff i preparatet. Ingen av preparatene avviker med mer enn 10 % av deklart mengde virkestoff. Synephrine ”Top Formula” er laget av planteekstrakter, og plantemateriale er generelt vanskelig å standardisere. Siden bare tre paralleller av preparatet ble analysert i dette forsøket, kan det ikke utelukkes at større variasjoner i konsentrasjon av synefrin i andre tabletter kan forekomme, selv om resultatene av de tre parallellene i dette tilfellet viste liten variasjon. De tre parallellene av oktopaminpreparatet som ble analysert viste større variasjon i beregnet innhold av oktopamin, men prosentvis avvik fra deklart mengde blir allikevel ikke så stor sett ut ifra det totale innholdet av virkestoff. Ut ifra resultatene av dette forsøket er det rimelig å anta at tablettene og kapslene som blir administrert til forsøkspersonene under hovedforsøket inneholder henholdsvis 100 mg synefrin og 500 mg oktopamin.

Analyse av næringsmidler

Analyse av ulike næringsmidler viste at det var liten forskjell i innhold av synefrin i appelsinjuice, appelsinmarmelade og malt pomeransskall. Ut ifra tilgjengelig litteratur antok man på forhånd at innholdet av synefrin ville være høyere i appelsinmarmelade og pomeransskall enn i appelsinjuice. Spesielt var det forventet at konsentrasjonen av synefrin ville være høyere i malt pomeransskall og i appelsinmarmeladen laget av bitterappelsin enn i de ulike typene appelsinjuice. Det er fordi det ikke er vanlig å benytte bitterappelsiner i produksjonen av appelsinprodukter i Norge, noe som ble bekreftet av en av produsentene, Stabburet AS. Den målte konsentrasjonen av synefrin i appelsinmarmeladene og i pomeransskall er derfor påfallende lave sammenlignet med konsentrasjonen i appelsinjuice. Dette kan indikere at homogenisering eller ekstraksjon av synefrin fra de faste stoffene er ufullstendig.

Økt utbytte av væske-væske-ekstraksjon

Resultatet av utbytteforsøket viste et signifikant bedre utbytte ved bruk av 5 ml organisk fase i forhold til 2,5 ml organisk fase, noe som var forventet. Ved å dampe inn standardløsningene før opparbeidelsen oppnådde man ikke noen stor gevinst på utbyttet. Mengden metanol som tilsettes via internstandard vil ikke påvirke fordelingen av analyttene mellom de ulike fasene, og derfor heller ikke utbyttet av ekstraksjonen i stor grad. Siden dette også var et tidkrevende trinn i opparbeidelsen ble det ikke inkludert. I den videre væske-væske-opparbeidelsesmetoden som ble benyttet ble derfor ikke standardløsningene dampet inn, men mengden organisk fase ble økt til 5 ml.

Utskillelsesforsøk

Prøvene fra utskillelsesforsøket ble opparbeidet med væske-væske-ekstraksjonsmetoden og med bametan som intern standard siden det var den metoden som var aktuell på det tidspunktet forsøket ble utført.

Utskillelsesprofilen viser at utskillelseshastigheten for synefrin var størst mellom 2 og 6 timer etter inntak, og utskillelseshastigheten for oktopamin var størst mellom 2 og 9 timer etter inntak for den aktuelle forsøkspersonen. Innen 24 timer var konsentrasjonsnivåene i urin tilbake til utgangspunktet før inntak for begge analyttene. Siden forforsøket kun inkluderte én forsøksperson ble det valgt å utvide prøvetakingsperioden med en spotprøve etter 72 timer i hovedforsøket, for å være sikker på at man ville fange opp variasjoner i utskillelsesprofilen hos flere forsøkspersoner.

Utskillelseshastigheten korrelerer med konsentrasjonen i urin, som var høyest på de tidspunktene som utskillelseshastigheten var størst. Maksimal konsentrasjon av analytt i urin var 70 µg/ml for synefrin og 350 µg/ml for oktopamin. Verdiene for væske-væske opparbeidelsen viste seg å være i samsvar med de konsentrasjonene som ble funnet i prøvene fra hovedforsøket, som ble opparbeidet med fast- fase-ekstraksjon.

4.2 Valideringen

Når man utvikler en analysemetode som omfatter flere analytter kan det være vanskelig å oppnå optimale betingelser for alle analyttene. Hvis noen av parametrene faller utenfor de forhåndsbestemte kravene man satte til resultatene, må man i hvert enkelt tilfelle vurdere om de allikevel kan være akseptable ut ifra hva metoden skal anvendes til.

I denne oppgaven var det ønskelig å validere en metode som skulle benyttes til å kvantifisere utskilte nivåer av synefrin og oktopamin i urinprøver. Hovedfokus var derfor å kunne kvantifisere i et størst mulig konsentrasjonsområde, og ikke nødvendigvis kunne kvantifisere lave konsentrasjoner med høy presisjon og nøyaktighet.

Under valideringen ble det oppdaget en interferens i blankprøvene som påvirket kvantifiseringen av oktopamin. Ved å bytte kvantifiseringsion fra $m/z = 102$ til $m/z = 267$ for oktopamin unngikk man denne interferensen, og metoden har god selektivitet/sensitivitet for både synefrin og oktopamin.

Standardkurvene til oktopamin hadde generelt en høy korrelasjonskoeffisient, og lineariteten anses som akseptabel. Standardkurvene for synefrin har en lavere korrelasjonskoeffisient. Siden dette er forårsaket av spredte enkeltstående verdier som avviker fra kurven i det lave konsentrasjonsområdet, og ikke en generell tendens grunnet for eksempel avbøying av kurven, anser man at kurven er tilstrekkelig lineær til å kunne kvantifisere synefrin i de konsentrasjonsområdene som er aktuelle i utskillelsesstudien.

For oktopamin ligger nøyaktigheten innenfor 20 % avvik fra sann verdi for alle konsentrasjonene. Verdiene for presisjon ligger under 10 % relativt standardavvik for alle konsentrasjoner av oktopamin både inter- og intra- assay. Inter-assay- nøyaktigheten og presisjonen er generelt litt dårligere enn intra-assay- nøyaktigheten og presisjonen, noe som er i samsvar med at sannsynligheten for at tilfeldige feil oppstår er større mellom de ulike dagene. Alle verdier anses som akseptable for oktopamin.

Nøyaktigheten for synefrin ligger innenfor 25 % avvik fra sann verdi, og er generelt bedre inter-assay enn intra-assay. Dette kan skyldes tilfeldige feil som oppsto den dagen inter-assay-

nøyaktigheten av synefrin ble bestemt. Inter-assay-presisjonen ligger under 12 % relativt standardavvik, mens inter-assay-presisjonen ligger under 22 % relativt standardavvik. Dette er i utgangspunktet i overkant av hva man bør akseptere i det aktuelle konsentrasjonsområdet, men kan ha sammenheng med den lave korrelasjonskoeffisienten man observerte for standardkurvene, siden prøvene kvantifiseres ut ifra kurvene. En generell tendens er at både nøyaktighet og presisjon blir bedre ved høye konsentrasjoner, og siden hovedfokus i dette tilfellet er å kvantifisere relativt høye konsentrasjoner av synefrin i urinprøver, anses resultatene for å være akseptable.

En faktor som kan påvirke presisjonen og nøyaktigheten er at det ikke benyttes deutererte internstandarder fordi det ikke kunne skaffes for de aktuelle analyttene. Deutererte internstandarder gir generelt bedre nøyaktighet og presisjon.

Instrumentpresisjonen var svært god både for synefrin og oktopamin.

Utbyttet av synefrin var over 80 % ved alle konsentrasjoner, og utbyttet av oktopamin var også over 80 % for både middels og høy konsentrasjon. Utbyttet av oktopamin ved lav konsentrasjon var bare litt over 60 %. En mulig årsak til dette kan være et adsorpsjonsproblem, der en viss mengde oktopamin for eksempel kan adsorberes til glassutstyr som brukes under opparbeidelsen. Ved lavere konsentrasjoner vil mengden som eventuelt adsorberes kunne utgjøre en større prosentandel av den totale mengden analytt, og utslaget på utbyttet vil bli større. Utbyttet for både synefrin og oktopamin opparbeidet med fast-fase-ekstraksjon er allikevel vesentlig bedre enn ved bruk av væske-væske-ekstraksjon, og siden det i de fleste tilfeller vil være høye konsentrasjoner av analytt i prøvene som skal kvantifiseres, kan verdiene aksepteres.

Verdier under LOQ kan ikke tallfestes, men verdier helt ned til LOD kan med sikkerhet sies å være tilstede i prøven. For både synefrin og oktopamin kan vi detektere konsentrasjoner over 0,1 µg/ml. Siden metoden i hovedsak skal anvendes til å kvantifisere høye konsentrasjoner av analytt i prøvene, er LOD og LOQ akseptable til dette formålet.

Metoden ble utviklet med tanke på å dekke et størst mulig konsentrasjonsområde, ikke å kvantifisere med høyest mulig presisjon ned mot deteksjonsgrensen. Alt i alt kan det

konkluderes med at analysemetoden er egnet til å undersøke problemstillingen i hovedforsøket, og at den kan anvendes til å kvantifisere konsentrasjonene av synefrin og oktopamin i prøvene fra utskillelsesforsøket.

4.3 Forsøket

4.3.1 Prøvene

På grunn av tidsbegrensing ble antallet forsøkspersoner i hovedforsøket begrenset, og resultatene er kun egnet til å påvise tendenser. For å dra entydige konklusjoner fra resultatet må det gjøres en studie der utvalget forsøkspersoner er større.

Det er den mengden analytt som skilles ut i uforandret og konjugert form som kvantifiseres i dette forsøket. Dette vil kun utgjøre en liten andel av den totale inntatte mengden virkestoff, siden mesteparten av den mengden synefrin og oktopamin som blir inntatt metaboliseres til hydroksymandelsyre før det skilles ut i urin.

Generelt for alle forsøkspersonene er at utskillelshastigheten for synefrin og oktopamin er høyest mellom 2 og 4 timer etter inntak. Innen 24 timer inntak var konsentrasjonen i urin tilbake på samme nivå som før inntak. Dette er i samsvar med de resultatene som er funnet i litteraturen for lignende forsøk. (33, 34) Det er også en tydelig korrelasjon mellom utskillelshastighet og gjennomsnittlig konsentrasjon i fraksjonen for både synefrin og oktopamin.

En kilde til usikkerhet i resultatene ved slike forsøk vil alltid være forsøkspersonenes compliance. Compliance beskriver i dette tilfellet forsøkspersonenes evne eller vilje til å etterfølge instruksene som gis i forbindelse med forsøket. Eksempler på dårlig compliance kan være at urin ikke samles til gitte tidspunkter, at ikke hele urinvolumet innen et tidsrom samles, at prøvene ikke blir oppbevart på riktig måte frem til de leveres på laboratoriet, eller at preparatet ikke blir inntatt i det hele tatt. I dette tilfellet ble det besluttet å utelukke resultatene fra forsøksperson 1 for utskillelse av synefrin etter inntak av kosttilskuddspreparat på grunn av mistanke om mangelfull compliance. Dette ble vurdert ut ifra de sprikende resultatene i forhold til de andre forsøkspersonene og den sterkt avvikende utskillelsesprofilen.

For synefrin var det store variasjoner i maksimal utskilt konsentrasjon og maksimal utskilleleshastighet mellom forsøkspersonene. Maksimal utskilt konsentrasjon av synefrin etter inntak av synefrinholdig kosttilskuddspreparat varierte fra 15 til 140 $\mu\text{g/ml}$ mellom to av forsøkspersonene. Utskilleleshastigheten varierte fra 800 til 12000 $\mu\text{g/time}$. Mengden som ble utskilt i løpet av de 24 timene man hadde kontroll på hele urinvolumet varierte fra 3,2 til 50,6 % av inntatt mengde.

Etter inntak av appelsinmarmelade var det mindre variasjon i maksimal utskilt konsentrasjon av synefrin i urin mellom forsøkspersonene. Maksimal konsentrasjon varierte fra 0,25 til 4,5 $\mu\text{g/ml}$. Gjennomsnittlig utskilleleshastighet varierte fra 16 til 200 $\mu\text{g/time}$. Andelen utskilt av den totale inntatte mengden synefrin varierte fra 1 til 3,5 %.

Resultatene for utskillelse av oktopamin etter inntak av oktopaminholdig kosttilskuddspreparat viste en variasjon i maksimal konsentrasjon fra 35 til 60 $\mu\text{g/ml}$. Maksimal utskilleleshastighet var jevnt høy for alle forsøkspersonene, og varierte fra 2500 til 5000 $\mu\text{g/time}$. Andelen oktopamin utskilt i urin av den totale mengden inntatt varierte fra 0,4 til 3,6 %.

På grunn av tidsbegrensning ble synefrin og oktopamin i alle prøvene kvantifisert ut ifra den samme standardkurven som ble benyttet under valideringen. Det høyeste punktet på kurven var 5 $\mu\text{g/ml}$. Ideelt sett burde alle prøver som viste seg å ha konsentrasjoner høyere enn dette ved første analyse blitt fortynnet til konsentrasjonen havnet innenfor kurvens område, og vært opparbeidet og analysert på nytt. Siden det ikke var synlige tegn på overbelastning av kromatografisystemet eller metning av MS-signalet for noen av prøvene ble det vurdert at resultatene var tilstrekkelig nøyaktige til å si noe om tendenser i utskillelsesprofilene til analyttene.

Et moment som vil kunne forklare noe av variasjonene sett i konsentrasjonsberegningene for utskillelsen av synefrin, er resultatene for nøyaktighet og presisjon fra valideringen. Mens presisjonen var god for analyser gjort på samme dag, var nøyaktigheten dårligere. Presisjonen for analyser gjort på forskjellige dager var dårligere enn presisjonen innenfor en dag, mens nøyaktigheten av analyseresultatene var god. I de lave konsentrasjonsområdene var

presisjonen og nøyaktigheten dårligere enn ved de høye konsentrasjonene. Dette vil for prøver med lav innhold av synefrin kunne bety at de blir kvantifisert til ulik konsentrasjon, mens de i virkeligheten kanskje har en tilnærmet lik konsentrasjon av analytt. Siden målet med metoden var å dekke et størst mulig konsentrasjonsområde for å danne et bilde av utskillelsesprofilen til analyttene, kan man allikevel argumentere med at denne faktoren ikke er av stor betydning for det totale resultatet. Verdiene for presisjon som ble beregnet under valideringen vil uansett ikke påvirke analyseresultatene i stor nok grad til å kunne forklare de store variasjonene man ser i synefrinkonsentrasjoner i denne studien. Siden datamaterialet er begrenset, har man uansett bare grunnlag for å si noe om tendenser i resultatene, ikke til å dra entydige konklusjoner.

Et av målene med hovedforsøket var å se på mulighetene for å etablere en grenseverdi i urin for stoffene som kunne skille inntak av næringsmidler fra inntak av synefrin- og oktopaminholdige preparater. Siden antallet forsøkspersoner i denne studien er svært begrenset vil fastsettelse av en grenseverdi bare være et foreløpig forslag, da fastsettelse av grenseverdier må gjøres ut ifra studier som inkluderer en større populasjon. Hovedfokus ved etablering av grenseverdier er å unngå falske positive resultater. Falske positive resultater betyr i denne sammenheng resultater som overskrider grenseverdiene etter normalt inntak av næringsmidler. For å oppnå tilstrekkelig sikkerhet må grenseverdien legges høyt. Det betyr på den andre siden at man også må akseptere mange falske negative prøver. Det vil i tilfellet for synefrin bety at konsentrasjonen av analytt i prøven kan havne under grenseverdien selv etter inntak av 100 mg synefrin. Tidsvinduet hvor konsentrasjonen vil ligge over grenseverdien blir også smalt, spesielt i dette tilfellet, siden stoffene skilles raskt ut i urin etter inntak. For stimulerende stoffer er dette akseptabelt siden konsentrasjonen av stoffene må være høy for å gi effekt.

For oktopamin kan man foreslå en grense på 5 µg/ml. Ut ifra resultatene er det ikke holdepunkter for å si at personer vil ha en naturlig utskillelse av oktopamin i urin over 5 µg/ml. Antagelsen bygger blant annet på erfaringer ved Norges laboratorium for dopinganalyse, der det ikke har blitt funnet verdier av oktopamin over 0,5 µg/ml i urin. Oktopamin er heller ikke vist å skilles ut urin i større mengder etter inntak av næringsmidler med høyt innhold av biogene aminer.(33) Det vil med andre ord si at prøver med

konsentrasjon av oktopamin over 5 µg/ml kan anses som bevis på inntak av stoffet i form av medikament eller kosttilskudd.

I tilfellet for synefrin er bildet noe mer komplekst. Ønsket var å etablere en grenseverdi som kunne skille mellom inntak av synefrin ved bruk av kosttilskuddspreparater og legemidler, og inntak av synefrin i fra ulike næringsmidler som vil kunne finnes i et normalt kosthold.

Maksimal utskilt konsentrasjon i urin etter inntak av 100 mg synefrin varierer fra 14 til 140 µg/ml, mens maksimal konsentrasjon etter inntak av appelsinmarmelade varierer fra 0,25 til 4,5 µg/ml. Ved å sette en grenseverdi for synefrin på 10 µg/ml vil antagelig en stor andel av prøver havne over grenseverdien etter inntak av 100 mg synefrin, men noen kan også havne under grenseverdien selv ved et høyt inntak av synefrin. Antagelig vil mengden synefrin man får i seg gjennom et normalt inntak av ulike næringsmidler inkludert i et vanlig kosthold ikke føre til at konsentrasjonen i urin overskrider 10 µg/ml, men et høyt inntak av næringsmidler rike på synefrin vil kunne tenkes å gi høyere konsentrasjoner i urin enn 10 µg/ml. Ved å heve grenseverdien til 50 µg/ml, minimeres risikoen for falske positive resultater. Imidlertid vil dette medføre at bare en av tre forsøkspersoner i denne studien overskrider grenseverdien etter inntak av 100 mg synefrin. Samtidig vil en høyere grenseverdi gi et smalere påvisningsvindu.

Ut ifra resultatene er det rimelig å anta at utskillelsesprofilen til synefrin og oktopamin vil variere mye fra person til person. Både synefrin og oktopamin er gjenstand for first-pass metabolisme ved oralt inntak, noe som vil kunne gi variasjoner i absorpsjon og metabolisme fra person til person. Fenylefrin er rapportert å ha lav oral biotilgjengelighet på grunn av ujevn absorpsjon og metabolisme av MAO i tarmveggen og i leveren. (14) Det samme vil kunne være tilfelle for synefrin siden stoffet har de samme strukturegenskapene som fenylefrin, og dette vil kunne være en mulig forklaring på de spredte resultatene i utskillelsesprofilen av synefrin som ble sett mellom forsøkspersonene. Et utvidet forsøk som inkluderer et større antall forsøkspersoner vil være nødvendig for å kunne etablere en grenseverdi for synefrin og oktopamin i urin.

5 Konklusjon

En analysemetode for kvantifisering av synefrin og oktopamin i urin ble utviklet og validert. I analysemetoden ble det benyttet enzymatisk hydrolyse og fast-fase-ekstraksjon til opparbeidelse av prøvene. Fenylefrin og norfenefrin ble valgt som interne standarder for henholdsvis synefrin og oktopamin. Resultatene fra valideringen ble funnet tilfredsstillende, og analysemetoden ble anvendt videre i studien.

Et ble gjennomført et utskillelsesforsøk for å kartlegge utskillelsen av synefrin og oktopamin i urin hos 3 forsøkspersoner. Forsøkspersonene inntok på separate tidspunkt et kosttilskuddspreparat inneholdende 100 mg synefrin fra *Citrus aurantium*, et kosttilskuddspreparat med innhold av 500 mg oktopamin og appelsinmarmelade fra bitterappelsiner, funnet å inneholde 0,3 mg synefrin per gram marmelade. Alle urinprøvene fra forsøkspersonene ble analysert med hensyn på synefrin og oktopamin. Resultatene viste store variasjoner i utskilt mengde synefrin mellom forsøkspersonene. Konsentrasjonen av synefrin og oktopamin i urin etter inntak av kosttilskudd og næringsmiddel var høyest de første timene etter inntak, og innen 24 timer etter inntak var urinkonsentrasjonene tilbake til utgangspunktet.

Muligheten for å sette grenseverdier for synefrin og oktopamin i urin etter inntak av henholdsvis kosttilskuddspreparater og næringsmidler ble vurdert. Et foreløpig forslag til grenseverdi i urin for oktopamin ble satt til 5 µg/ml. Det er lite sannsynlig at naturlig utskillelse av oktopamin, eller utskillelse av oktopamin etter inntak av næringsmidler, vil kunne gi konsentrasjoner i urin som overstiger denne grenseverdien. For synefrin var fastsettelsen av en grenseverdi mindre opplagt. Et forslag til en grenseverdi for synefrin i urin ble satt til 50 µg/ml. Ved denne grenseverdien var det allikevel bare én av forsøkspersonene i studien som hadde konsentrasjoner av synefrin i urin over grenseverdien etter inntak av 100 mg synefrin. Det er svært lite sannsynlig at konsentrasjonen av synefrin i urin etter inntak av synefrinholdige næringsmidler vil kunne overstige denne grenseverdien.

På grunn av tidsbegrensing ble antallet forsøkspersoner i studien begrenset, og resultatene er kun egnet til å beskrive tendenser. For å kunne sette grenseverdier for synefrin og oktopamin i

urin som i størst mulig grad er egnet til å skille naturlig utskillelse av synefrin og oktopamin i urin fra utskillelsen etter inntak av kosttilskuddspreparater, må det gjøres studier som inkluderer et større antall forsøkspersoner.

Referanser

1. Thieme D, Hemmersbach P. (2010) Doping in Sports. Springer-Verlag, Berlin, 1-23.
2. Haug E, Birkeland KI, P. H. (1999) Glimt fra idrettens dopinghistorie. *Tidsskr Nor Lægeforen* **17**: 2538-2540.
3. Haug E, Birkeland KI, Hemmersbach P. (2000) Doping og idrettsutøvere *Medisinsk årbog*. Munkegård, København, 9-18.
4. WADA. Anti-doping Laboratories. www.wada-ama.org. Accessed 05.05.10
5. Antidoping Norge. www.antidoping.no. Accessed 05.05.10
6. Docherty JR. (2008) Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *Br J Pharmacol* **154**: 606-622.
7. (2010) World Anti-Doping Code Prohibited List 2010. WADA, www.wada-ama.org. Accessed 05.05.10
8. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. (2003) Pharmacology. Elsevier Science Limited, pp. 106-114, 123-107, 161-183.
9. Kakimoto Y, Armstrong MD. (1962) On the identification of octopamine in mammals. *J Biol Chem* **237**: 422-427.
10. Hengstmann JH, Konen W, Konen C, Eichelbaum M, Dengler HJ. (1974) The physiological disposition of p-octopamine in man. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **283**: 93-106.
11. Erspamer V. (1952) Identification of octopamine as l-p-hydroxyphenylethanolamine. *Nature* **169**: 375-376.
12. Kakimoto Y, Armstrong MD. (1962) The phenolic amines of human urine. *J Biol Chem* **237**: 208-214.
13. Stewart I, Wheaton TA. (1964) l-Octopamine in citrus: Isolation and identification. *Science* **145**: 60-61.
14. Sweetman SC. (2005) Martindale: The complete drug reference. Pharmaceutical Press, London.
15. Carpeno C, Galitzky J, Fontana E, Atgie C, Lafontan M, Berlan M. (1999) Selective activation of beta3-adrenoceptors by octopamine: comparative studies in mammalian fat cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **359**: 310-321.
16. Masten SA. (June 2004) Bitter Orange (*Citrus aurantium* var. amara) Extracts and constituents (+/-)-p-synephrine [CAS No.95-07-5] and (+/-)-p-octopamine [CAS No. 104-14-3] Review of Toxicological literature. Contract No. N01-ES-355515 In: Services USDoHaH (ed.). US National Toxicology Program.
17. Ibrahim KE, Couch MW, Williams CM, Fregly MJ, Midgley JM. (1985) m-Octopamine: normal occurrence with p-octopamine in mammalian sympathetic nerves. *J Neurochem* **44**: 1862-1867.
18. Zucchi R, Chiellini G, Scanlan TS, Grandy DK. (2006) Trace amine-associated receptors and their ligands. *Br J Pharmacol* **149**: 967-978.
19. Branchek TA, Blackburn TP. (2003) Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Curr Opin Pharmacol* **3**: 90-97.
20. Borowsky B, Adham N, Jones KA, et al. (2001) Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8966-8971.
21. Kirschbaum J, Rebscher K, Bruckner H. (2000) Liquid chromatographic determination of biogenic amines in fermented foods after derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride. *J Chromatogr A* **881**: 517-530.

22. Mayer HK, Fiechter G, Fischer E. (2009) A new ultra-pressure liquid chromatography method for the determination of biogenic amines in cheese. *J Chromatogr A*.
23. Huang KJ, Wei CY, Liu WL, Xie WZ, Zhang JF, Wang W. (2009) Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for sensitive determination of biogenic amines in rice wine samples. *J Chromatogr A* **1216**: 6636-6641.
24. Berry MD. (2004) Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *J Neurochem* **90**: 257-271.
25. Burchett SA, Hicks TP. (2006) The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Prog Neurobiol* **79**: 223-246.
26. Stewart I, Newhall WF, Edwards GJ. (1964) The Isolation and Identification of l-Synephrine in the Leaves and Fruit of Citrus. *Journal of Biological Chemistry* **239**: 930-932.
27. Pisano JJ, Oates JA, Jr., Karmen A, Sjoerdsma A, Udenfriend S. (1961) Identification of p-hydroxy-alpha-(methylaminomethyl) benzyl alcohol (synephrine) in human urine. *J Biol Chem* **236**: 898-901.
28. Haller CA, Benowitz NL, Jacob P, 3rd. (2005) Hemodynamic effects of ephedra-free weight-loss supplements in humans. *Am J Med* **118**: 998-1003.
29. Fugh-Berman A, Myers A. (2004) Citrus aurantium, an ingredient of dietary supplements marketed for weight loss: current status of clinical and basic research. *Exp Biol Med (Maywood)* **229**: 698-704.
30. Arbo MD, Larentis ER, Linck VM, et al. (2008) Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of Citrus aurantium extract and p-synephrine. *Food Chem Toxicol* **46**: 2770-2775.
31. Penzak SR, Jann MW, Cold JA, Hon YY, Desai HD, Gurley BJ. (2001) Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. *J Clin Pharmacol* **41**: 1059-1063.
32. Bent S, Padula A, Neuhaus J. (2004) Safety and efficacy of citrus aurantium for weight loss. *Am J Cardiol* **94**: 1359-1361.
33. Koch A, Sigmund G, Guddat S, Thevis M, Schänzer W. (2010) Octopamine and biogenic amines. Institute of Biochemistry, German Sport University Cologne.
34. Kusu F, Matsumoto K, Arai K, Takamura K. (1996) Determination of synephrine enantiomers in food and conjugated synephrine in urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal Biochem* **235**: 191-194.
35. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 21.
36. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 18.
37. Hoffmann Ed, Stroobant V. (2007) Mass Spectrometry Principles and Applications. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 15-17,266-270.
38. Gerards P, Bons U, Sawazaki J, Szigan J, Wertmann A. (1999) GC/MS in Clinical Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, pp. 53-63, 86, 101-102.
39. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. (2004) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, London, 441.
40. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 23.
41. www.waters.com. (2010) Oasis SPE/ Oasis MCX. Accessed 11.05.10
42. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 22.

43. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 17.
44. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 20.
45. Agilent Technologies. (1999) 5973 Network Mass Selective Detector, Hardware Manual. Agilent technologies, 298-316.
46. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. (2004) Legemiddelanalyse. Fagbokforlaget, Bergen, Kapittel 28.

