

Elektromembranekstraksjon av narkotiske stoffer fra fullblod og likblod

Ragnhild Elén Gjulem Jamt



Faggruppe for Legemiddelanalyse,
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

Elektromembranekstraksjon av narkotiske stoffer fra fullblod og likblod

Ragnhild Elén Gjulem Jamt

Masteroppgaven ble gjennomført i perioden januar 2010 – mai 2011 ved Faggruppe for Legemiddelanalyse, Avdeling Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Veiledere: Post doctor Astrid Gjelstad

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Professor Knut Einar Rasmussen

Innholdsfortegnelse

INNHALDSFORTEGNELSE	3
FORORD	5
SAMMENDRAG	6
FORKORTELSER	7
1. INNLEDNING	9
2. TEORI	12
2.1 EME	12
2.2 KAPILLÆRELEKTROFORESE (CE)	16
2.3 LC-MS	17
3. EKSPERIMENTELT	21
3.1 MODELLSUBSTANSER	21
3.2 LØSNINGER OG BUFFERE	26
3.2.1 <i>Stamløsninger</i>	26
3.2.2 <i>Standardløsning</i>	26
3.2.3 <i>Donorfaser (prøveløsninger)</i>	26
3.2.4 <i>Akseptorfaser</i>	28
3.2.5 <i>Organiske faser</i>	29
3.2.6 <i>Separasjonsbuffer</i>	29
3.2.7 <i>Vaskeløsning</i>	30
3.2.8 <i>Mobilfaser</i>	30
3.3 ELEKTROMEMBRANEKSTRAKSJON	30
3.4 BEREGNING AV UTBYTTE OG OPPKONSENTRERING	31
3.5 BETINGELSER FOR CE	32
3.6 BETINGELSER FOR LC-MS	33

3.7	BETINGELSER FOR UPLC-MS-MS	34
4.	RESULTATER OG DISKUSJON	36
4.1	OPTIMALISERING AV ORGANISK FASE.....	36
4.2	OPTIMALISERING AV AKSEPTORFASER	38
4.3	OPTIMALISERING AV DONORFASE	39
4.4	OPTIMALISERING AV SPENNING.....	40
4.5	OPTIMALISERING AV EKSTRAKJONSTID	44
4.6	VALIDERING.....	47
4.6.1	<i>Deteksjonsgrense.....</i>	<i>47</i>
4.6.2	<i>Linearitet.....</i>	<i>47</i>
4.6.3	<i>Repeterbarhet.....</i>	<i>47</i>
4.7	REELLE PRØVER	51
5.	KONKLUSJON	60
	KILDELISTE.....	62

Forord

Først og fremst vil jeg takke mine dyktige veiledere doktor Astrid Gjelstad og professor Stig Pedersen-Bjergaard for svært god hjelp og tilrettelegging av arbeidet under masteroppgaven. Dere har tålmodig svart på alle spørsmål, vært positive og inspirerende. I tiden jeg har vært på avdelingen har dere på en veldig fin og lærerik måte gitt meg et godt innblikk i faget og hva forskning innebærer.

En stor takk til professor Knut Einar Rasmussen for kloke forslag og innspill i forbindelse med arbeidet på laboratoriet. Jeg vil også takke stipendiat Lars Erik Eng Eibak så mye for opplæring og veiledning i bruk av EME-metoden, og hjelp med gjennomføringen av forsøk med reelle prøver.

Folkehelseinstituttet, divisjon for retts toksikologi og rusmiddelforskning ved doktor Elisabeth Leere Øiestad og professor Asbjørg Solberg Christophersen fortjener mange takk for samarbeidet og for øvrig god hjelp. At jeg fikk komme til dere å gjøre forsøk på reelle prøver var veldig inspirerende og noe jeg setter stor pris på.

I tillegg vil jeg takke Hamid, Jeanette, Karoline og ansatte på avdelingen for at dere gjorde tiden som masterstudent til en veldig hyggelig og minnerik tid for meg. En spesiell takk til Hilde som hjalp meg med korrektur, kom med fine innspill og hjalp oss da vi var på besøk på Folkehelseinstituttet.

Til sist vil jeg takke Armika for mange fine kaffepauser og besøk på kontoret.

Oslo, mai 2011

Ragnhild Elén Gjulem Jamt

Sammendrag

I denne oppgaven har det blitt arbeidet med å utvikle et stillestående EME-system for ekstraksjon av de narkotiske stoffene 2,5-dimetoksi-4-iodamfetamin (DOI), katinon, ketamin, 3,4-metylendioksi-amfetamin (MDA), 3,4-metylendioksi-metamfetamin (MDMA) og metamfetamin fra ubehandlet fullblod. Det har vært fokusert på å optimalisere systemet for små prøvevolumer, på et lavt spenningsnivå og med kort ekstraksjonstid.

I det endelige oppsettet ble det ekstrahert fra 80 µl fullblod (donorfase) over i 10 µl 10 mM CH₃COOH (akseptorfase). Den kunstige væskemembranen ble laget ved å dyppe en 5 cm lang hulfiber i det organiske løsemiddelet ENB i 5 sekunder. Akseptorfasen ble sprøytet inn i hulfiberlumen og katoden ble ført inn. Deretter ble hulfiberen med akseptorfase og katode plassert sammen med anoden i donorfasen. Et spenningspotensial på 15 V ble satt på og det ble ekstrahert 5 minutter. Etter endt ekstraksjon ble hulfiberen tatt ut av donorfasen. Akseptorfasen ble trukket ut av hulfiberlumen og analysert med CE eller LC-MS.

Systemet ble validert etter optimalisering av de ulike betingelsene og parameterne. Deteksjonsgrensene for alle stoffene var godt under nedre del av anslått relevant konsentrasjonsområde på 40 ng/ml. Det relative standardavviket på konsentrasjonsnivåene 10 ng/ml, 50 ng/ml og 500 ng/ml lå henholdsvis mellom 8-27 %, 12-26 % og 7-32 %. Regresjonskoeffisienten var større enn 0.99 på alle målte konsentrasjoner (10-250 ng/ml).

Avslutningsvis ble det optimaliserte EME-systemet testet på reelle prøver ved Nasjonalt folkehelseinstituttet (FHI), ved divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning. Av åtte prøver var tre likblod og fem var fullblod fra levende personer. Resultatene fra EME-ekstraksjonene ble sammenlignet med resultater fra FHI hvor prøveopparbeidelsesmetoden var basert på LLE ved screening av amfetaminer, og det prosentvise avviket lå på mellom 4-34 %. Analysene viste at EME ga rene ekstrakter både fra ubehandlet fullblod og likblod.

Forkortelser

APCI (atmospheric pressure chemical ionisation)	kjemisk ionisering ved atmosfærisk trykk
CE (capillary electrophoresis)	kapillærelektroforese
CH ₃ COOH	eddiksyre
CH ₃ COONa	natriumacetat
DEHP	di(2-etylheksyl)fosfat
DOI	2,5-dimetoksi-4-iodamfetamin
EME	elektromembranekstraksjon
ENB	1-etyl-2-nitrobenzen
ESI	elektrosprayionisering
GC (gas chromatography)	gasskromatografi
H ₃ PO ₄	orto-fosforsyre
HCl	saltsyre
HCOOH	maursyre
HPLC (high performance liquid chromatography)	væskekromatografi
IPNB	1-isopropyl-4-nitrobenzen
LC-MS (liquid chromatography-mass spectrometry)	væskekromatografi med massespektrometer som deteksjon
LLE (liquid-liquid extraction)	væske-væske-ekstraksjon
LPME (liquid-phase microextraction)	væskefase mikroekstraksjon

MDA	3,4-metylendioksi-amfetamin
MDMA	3,4-metylendioksi-metamfetamin
MDMA d5	3,4-metylendioksi-metamfetamin med fem deuterium
Metamfetamin d11	metamfetamin med elleve deuterium
MRM	multiple reaction monitoring
Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O	dinatriumhydrogenfosfat-dodekahydrat
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	natriumdihydrogenfosfat-monohydrat
NaOH	natriumhydroksid
NPOE	2-nitrofenyl-oktyleter
NPPE	2-nitrofenyl-pentyleter
S/N-forhold (signal-to-noise)	forhold mellom signal og støy
SIM	selektiv ionemonitorering
SPE (solid-phase extraction)	fast-fase-ekstraksjon
SPME (solid-phase microextraction)	fastfase mikroekstraksjon
TEHP	tris(2-etylheksyl)fosfat
TFA	trifluoreddisyre
UPLC-MS-MS (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry)	væskrokromatografi koblet med tandem massespektrometri som deteksjon
UV	ultrafiolett

1. Innledning

For å gjøre analyser av kompliserte, biologiske matriks som blod, plasma og urin stilles det krav til grundig opparbeidelse av prøvene før introduksjon i analyseapparatene. Tradisjonelt har væske-væske-ekstraksjon (LLE) og fast-fase-ekstraksjon (SPE) vært mye brukt for å opparbeide biologiske prøver før analyse [1]. Disse metodene har imidlertid sine ulemper. LLE krever bruk av relativt store mengder organiske løsemidler, er vanskelig å automatisere og er lite fleksibel med hensyn på ekstraksjonskjemi [2]. SPE er en teknikk som også involverer relativt store mengder organiske løsemidler og utstyret som benyttes er kostbart. Både LLE og SPE er i tillegg tidkrevende prosesser [3]. Sett i lys av dette, ble det på nittitallet introdusert miniatyriserte varianter av LLE og SPE kalt væskefase mikroekstraksjon (LPME) og fastfase mikroekstraksjon (SPME). Med dette har det blitt oppnådd en vesentlig bedre opprensing og oppkonsentrering av analytter fra biologiske prøver. Bruken av organiske løsemidler er redusert eller eliminert, og ekstraksjonsprosessene har blitt automatiserte [4].

De første arbeidene gjort med LPME ble publisert i 1996 [5,6]. Denne tidlige versjonen av LPME var basert på ekstraksjon av analytter fra en vandig fase over i en dråpe med organisk løsemiddel ved passiv diffusjon. Metoden hadde imidlertid sine ulemper da det viste seg at dråpen med organisk løsemiddel fort kunne løsne og løses ut i prøven. Som en løsning på dette stabilitetsproblemet ble det senere utviklet hulfiberbasert LPME [7]. I dette systemet ble det benyttet en porøs polypropylenhulfiber til å konstruere en tynn væskemembran. Hulfiberen ble dyppet i et organisk løsemiddel, og ved hjelp av kapillærkrefter ble løsemiddelet holdt på plass i porene på fiberen. Den vandige fasen analyttene skulle ekstraheres over i (akseptorfase), ble sprøytet inn i hulrommet (lumen) på fiberen og videre ble fiberen med akseptorfase plassert i en vandig prøve (donorfase). Etter ekstraksjonen ble akseptorfase tatt ut av hulfiberlumen for videre analyse.

LPME kan settes opp både som et 2-fasesystem og som et 3-fasesystem [4]. I et 2-fasesystem er akseptorfase et organisk løsemiddel, i noen tilfeller det samme som det som blir brukt i væskemembranen. Dette systemet er direkte kompatibelt med analyse på gasskromatograf (GC). I et 3-fasesystem er akseptorfase en vandig løsning og systemet er kompatibelt med analyse på væskeskromatograf (HPLC) eller kapillærelektroforese (CE).

I LPME er massetransporten av sure og basiske forbindelser avhengig av optimale pH-betingelser i donor og akseptorfase. Det oppnås ved å justere pH i donorfasen slik at analyttene foreligger på uladet form og pH i akseptorfasen slik at analyttene blir fullstendig ioniserte i den. Fordi LPME er basert på passiv diffusjon vil ekstraksjonen i et 3-fasesystem fremmes av at analyttene har en høy fordelingskoeffisient mellom donorfase og organisk fase, og mellom organisk fase og akseptorfase [8]. For hydrofile analytter vil fordelingskoeffisienten være lav og for å ekstrahere denne typen stoffer mer effektivt tilsettes en ionpaddner til den organiske fasen [9]. Å riste systemet under ekstraksjon har vist seg å være av betydning for ekstraksjonshastigheten og utbyttet [7,10-12]. Dette skyldes at det i grensesnittet mellom donorfase og organisk fase bygges opp et lag av analytter. Laget vil gradvis bli tykkere mens ekstraksjonen pågår, noe som gjør det vanskeligere for analyttene å diffundere over i den organiske fasen. Tilføres systemet risting vil dette laget minske som følge av konveksjon i donorfasen, og analyttene trenger lettere igjennom til organisk fase.

Ekstraksjonsutbyttet i forsøk gjort med LPME er vanligvis på mellom 10-90 % [4]. I tillegg til høyt utbytte gir metoden høy grad av oppkonsentrering. Det er tidligere rapportert om 27 000 ganger oppkonsentrering fra vandige prøver [13]. I opparbeidelse av biologiske prøver er det svært viktig at prøveoppbeidelsesmetoden gir god opprensing for at ikke uønskede matrikskomponenter skal interferere med videre analyser. Forskning har vist at også til dette formålet er LPME en godt egnet metode [14]. Til tross for at LPME har blitt optimalisert på ulike måter og utviklet seg til å bli et attraktivt alternativ til de tradisjonelle teknikkene, er dette likevel en relativt tidkrevende prosess som tar 15-60 minutter [11].

I 2005 ble for første gang elektromembranekstraksjon (EME) introdusert [15]. Konseptet viste seg å kunne isolere, oppkonsentrere og rense prøvene på en rask og effektiv måte. Ekstraksjonsutbyttet for relativt hydrofobe basiske stoffer fra vandige prøveløsninger lå på mellom 70-79 % med en oppkonsentreringsfaktor på mellom 7-7,9. Dette ble oppnådd ved å ekstrahere med 300 V i bare 5 minutter. Denne måten å ekstrahere på var en videreutviklet form av LPME der oppsettet var likt bortsett fra at man i tillegg hadde to elektroder og en spenningskilde. Prinsippene for ekstraksjonene var imidlertid forskjellige. I stedet for å utnytte en pH-gradient som drivkraft for ekstraksjonen, ble det lagt på et elektrisk felt over væskemembranen som drev analyttene fra donorfasen til akseptorfasen.

I tillegg til å kunne ekstrahere hydrofobe baser, viste senere forskning at også mer hydrofile basiske forbindelser [16], sure forbindelser [17] og peptider [18] med hell kunne ekstraheres med EME fra vandige prøver. Kompliserte, biologiske matrikser som fullblod, plasma, urin og morsmelk har også blitt testet med EME, og forsøkene viste at metoden ga svært god opprensing og oppkonsentrering av prøvene, samt relativt høyt utbytte [1,19].

Arbeidet i denne oppgaven har hatt til hensikt å optimalisere EME for ubehandlet fullblod under fysiologiske forhold i et stillestående system. Fordi det tidligere er blitt vist at EME er en spesielt godt egnet metode for ekstraksjon fra små prøvevolumer [10], har dette vært et av fokusområdene. Modells substansene som er brukt i oppgaven er alle potensielle misbrukerstoffer og det var relevant å optimalisere systemet for små volumer av ubehandlet fullblod med tanke på at man i retts toksikologisk sammenheng ofte har svært begrensede prøvevolumer. Innen retts toksikologi er det også viktig at analysene går raskt. Av den grunn har det også vært fokusert på korte ekstraksjonstider under optimaliseringen av EME-systemet. Alle stoffene som ble brukt i oppgaven er baser med pKa-verdier på mellom 6.5-10.4. Dette innebærer at de er helt eller delvis ladet ved fysiologisk pH, og er derfor egnet til å ekstraheres med EME. I tillegg til dette er stoffene relativt hydrofobe forbindelser med log P-verdier (fordelingsforholdet mellom n-oktanol og vann) på mellom 0.6-3.0, noe som tilsier at de vil kunne løses i en organisk fase. Utviklingen av EME-systemet for de gitte modells substansene har også bestått i å optimalisere akseptorfasen, den organiske fasen og spenningen.

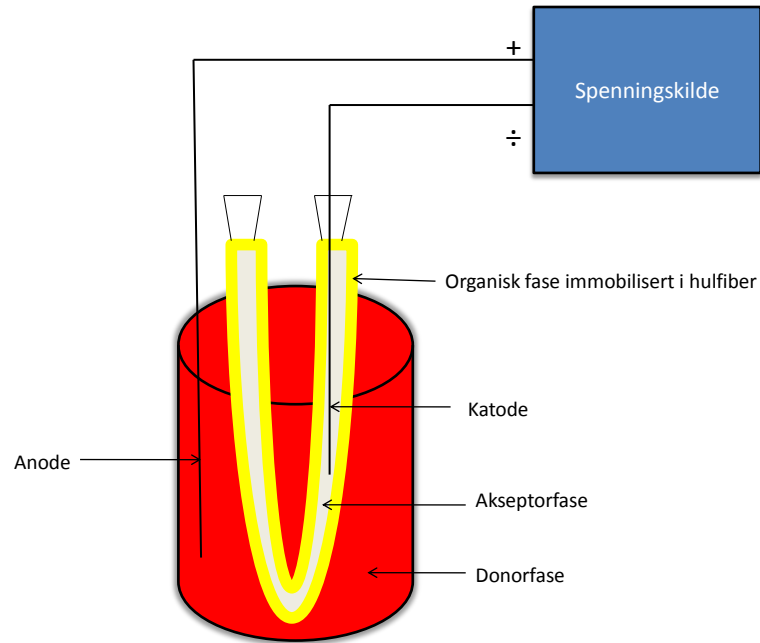
Innen retts toksikologi blir det gjort analyser på stoffmisbruk for å avdekke kjøring i påvirket tilstand, avklare dødsårsaker eller for å oppdage bruk av stoffer i blant annet vold- og voldtektssaker [20]. De narkotiske modells substansene i oppgaven ble valgt på bakgrunn av deres relevans innen retts toksikologisk forskning. Rusmiddelstatistikk fra 2009 utgitt av Nasjonalt Folkehelseinstituttet, fokuserte på analyserte blodprøver fra bilførere som var stanset av politiet grunnet mistanke om ruspåvirket kjøring. Resultatene viste at forekomsten av metamfetamin var økende. Fra 2001 til 2009 var funnene firedoblet. Forekomsten av MDMA viste en synkende trend. Stoffet ble i 2009 påvist i 0,3 % av blodprøvene, mens det rundt årtusenskiftet ble påvist i ca. 4 % av alle blodprøver [21].

2. Teori

2.1 EME

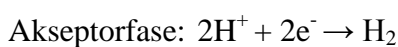
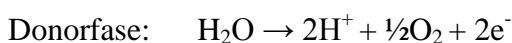
EME bygger på kunnskapen om at kjemiske og biokjemiske stoffer kan migrere i en løsning når det pålegges et spenningspotensial [15]. Denne formen for transport kalles elektrokinetisk migrasjon. Ved å benytte spenning som drivkraft har man i tillegg til rask ekstraksjonshastighet og høy selektivitet, stor fleksibilitet fordi spenningen enkelt kan justeres både i størrelse og retning via spenningskilden [22]. Disse egenskapene gjør EME til en relevant metode for prøveopparbeidelse også for fremtidig forskning.

Oppsettet for EME består av donor- og akseptorfase, en organisk fase immobilisert i en hulfiber, en spenningskilde og to elektroder. Et skjematisk oppsett er vist i figur 2-1. Ved ekstraksjon av basiske substanser, fylles donorfasen i en vial og den positive elektroden (anoden) plasseres i prøven. Den organiske fasen immobiliseres i en porøs hulfiber ved å dyppe fiberen i en organisk fase i noen sekunder. Deretter fylles hulrommet i fiberen med akseptorfase, og den negative elektroden (katoden) føres inn. Fiberen med akseptorfase og katode plasseres i vialen med donorfase og anode. Spennig tilføres systemet ved å koble elektrodene til en spenningskilde. Som tidligere nevnt er det spenningen som er drivkraften i ekstraksjonen og for at analyttene skal migrere i systemet må pH være justert slik at de foreligger på ladet form. For basiske analytter surgjøres donorfasen slik at de blir positivt ladet og kan migrere gjennom væskemembranen mot katoden i akseptorfase [15]. I en del tilfeller settes ekstraksjonsenheten til risting for å øke utbyttet. Etter endt ekstraksjon tas akseptorfase ut av hulfiberlumen for videre analyse.



Figur 2-1 Oppsett for EME

En viktig forutsetning for ekstraksjoner der man bruker spenning som drivkraft er at det går strøm gjennom alle de tre fasene [15]. Donorfasen og akseptorfasen er vandige og kan derfor lede strøm godt. Det er hulfiberen med den organiske fasen som gir den største elektriske motstanden i systemet og løsemiddel må derfor velges med tanke på dette. For at analyttene skal kunne migrere gjennom væskemembranen må det organiske løsemiddelet utvise en viss polar karakter eller ha et visst vanninnhold slik at det har tilstrekkelig ledningsevne til at det elektriske feltet kan penetrere. Med minkende motstand i væskemembranen vil det bli økt transport av analytter mot akseptorfasen. Dette er imidlertid ikke den eneste konsekvensen av å velge et organisk løsemiddel med høy elektrisk ledningsevne. Jo mer strøm det går i systemet, desto mer elektrolyse vil det skje ved elektrodene. Forutsatt at væskemembranen og analyttene er inerte for elektrodereaksjoner, skjer elektrolysen etter følgende reaksjoner:



Resultatet av disse reaksjonene er gassdannelse av H_2 og O_2 . Teoretisk sett vil også pH i donorfasen synke og pH i akseptorfasen øke, noe som igjen vil endre utgangspunktet for

ekstraksjonen [16]. Valget av organisk løsemiddel bør derfor være basert på i hvilken grad det leder strøm og hvor stor sjanse det er for gassdannelse [15].

Et annet viktig moment som må vurderes ved valg av organisk løsemiddel er hvor godt løselig analyttene er i det. Utgangspunktet for denne vurderingen er de aktuelle substansenes hydrofobe eller hydrofile karakter, og log P-verdien for disse blir ofte lagt til grunn for valget. Upolare forbindelser vil raskt fordeles over i organiske løsemidler som en følge av høy fordelingskoeffisient. For mer polare substanser vil fordelingen over i den organiske fasen gå tregere eller de forblir i den vandige donorfasen. For å øke transporten av disse substansene over væskemembranen kan man som tidligere nevnt tilsette den organiske fasen en ionpardanner. Dette har blant annet blitt gjort i forsøk med polare basiske substanser hvor den organiske fasen ble tilsatt ionpardanneren di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) [16]. Det antas at DEHP danner hydrofobe ionpar med de polare forbindelsene i grensesnittet mellom donorfasen og den organiske fasen. DEHP-molekylene orienteres med de hydrofobe kjedene inn i den organiske fasen, og den ioniserte fosfatdelen mot den sure vandige fase. De nøytrale og hydrofobe kompleksene som dannes mellom DEHP-molekyler og de basiske analyttene øker på denne måten transporten av disse gjennom den organiske fasen. I grensesnittet mellom den organiske fasen og akseptorfasen, blir analyttene byttet ut med protoner og dermed frigjort i akseptorfasen. pH i akseptorfasen må ligge under pKa-verdien for DEHP for at molekylene skal kunne protoneres. Høy konsentrasjon av protoner i akseptorfasen er derfor en forutsetning [18].

I det samme forsøket som er nevnt over så man også at DEHP undertrykket ekstraksjonen av mer hydrofobe substanser, noe som indikerer at væskemembranen med kjemisk modifisering kan gjøre ekstraksjonene mer selektive.

I tidligere arbeid er det gitt en beskrivelse av fluksen under EME basert på Nernst-Planck ligningen [23]. Fluks er et begrep som sier noe om antall molekyler som går gjennom et gitt plan i løpet av en gitt tid. En modifisert versjon av ligningen der man antar at alle analytter kun har én ladning og at væskemembranen er uladet, beskriver fluksen ved steady state, J_i , for den *i*te kationiske substansen over væskemembranen:

$$J_i = -\frac{Di}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi}\right) \left(\frac{\chi^{-1}}{\chi - \exp(-v)}\right) (c_i - c_{i0} \exp(-v)) \quad (2-1)$$

I ligning 2-1 er D_i et uttrykk for ionets diffusjonskoeffisient, h er for tykkelsen på væskemembranen, v er for en dimensjonsløs drivkraft og er definert i ligning 2-2. χ er for forholdet mellom den totale ionekonsentrasjonen i donorfase og den totale ionekonsentrasjonen i akseptorfase. c_i er et uttrykk for konsentrasjonen av det i te kationet i grenseflaten mellom væskemembran og donorfase, mens c_{i0} er for konsentrasjonen i grenseflaten mellom akseptorfase og væskemembran.

$$v = \frac{z_i e \Delta \phi}{kT} \quad (2-2)$$

Ligning 2-2 definerer den dimensjonsløse drivkraften. Utrykket z_i beskriver kationets ladning, e beskriver elementærladningen, $\Delta \phi$ beskriver forskjellen i det elektriske spenningspotensialet over væskemembranen, k er Boltzmanns konstant og T beskriver absoluttemperaturen.

Med bakgrunn i disse ligningene kan teoretisk sett massetransporten over væskemembranen økes. Dette kan gjøres ved å øke den dimensjonsløse drivkraften v hvilket innebærer at spenningen økes. Dersom temperaturen T i ekstraksjonssystemet øker vil v minke, men temperaturen har også innvirkning på diffusjonskoeffisienten, D_i . Denne faktoren vil øke med økende temperatur. Det er blitt vist at den negative temperatureffekten på den dimensjonsløse drivkraften er av liten betydning sammenlignet med den positive temperatureffekten på diffusjonskoeffisienten [23]. I tillegg kan ionebalansen, χ , reduseres. For å oppnå dette reduseres ionestyrken i donorfase i forhold til akseptorfase. Av disse nevnte justeringene har det blitt vist at spenningen og ionebalansen er av størst betydning [23]. Fluksen i systemet styres også av konsentrasjonsgradienten over væskemembranen. Det betyr at en høy konsentrasjon av analytter på donorsiden av væskemembranen i forhold til akseptorsiden er gunstig for en økt fluks [24].

EME er en teknikk der også ekstraksjonstiden spiller en viktig rolle. Det har blitt vist at ekstraksjonsutbyttet øker med tiden inntil et visst punkt der systemet når steady state. Etter at steady state er oppnådd ser man liten eller ingen økning i utbyttet [15]. Det kan være flere årsaker til dette. Blant annet vil konsentrasjonsgradienten over væskemembranen minke som en følge av at analyttene ekstraheres over i akseptorfase. En annen prosess som vil påvirke ekstraksjonen er at det med økende ekstraksjonstid vil bygges opp et lag av ioner i grensesnittene på begge sider av væskemembranen noe som vil hindre transport av analytter.

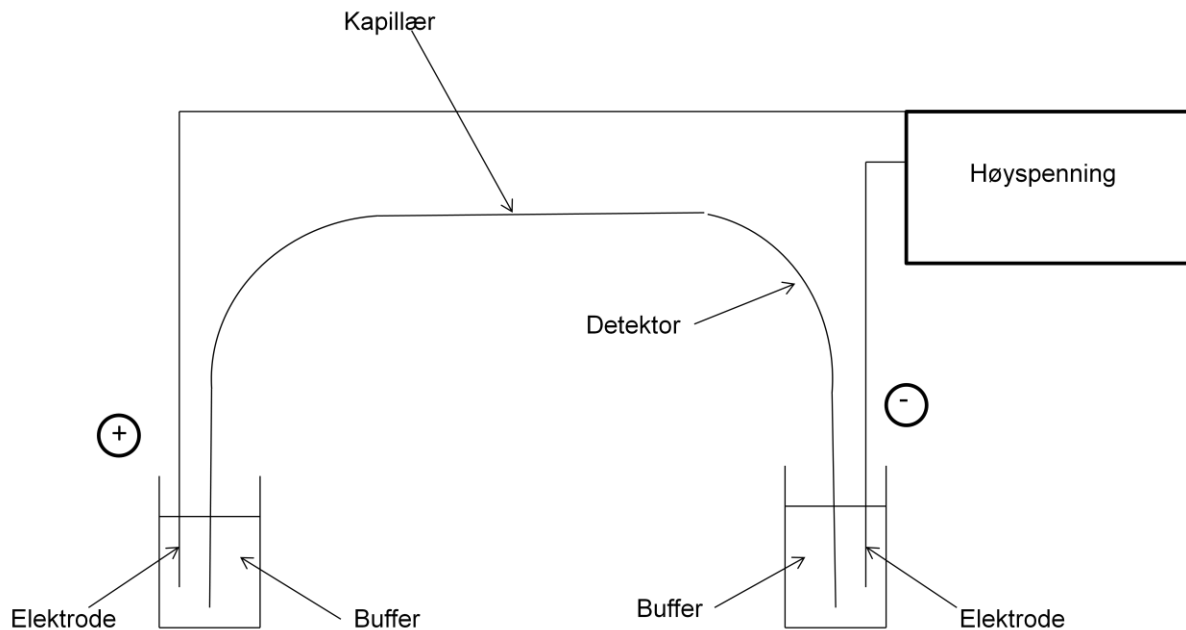
Tidligere forsøk har også vist at ekstraksjonstiden kan variere for ulike stoffer fordi de har ulik løselighet og elektrokinetisk mobilitet i væskemembranen [10].

Ved å optimalisere de ulike bestanddelene i EME har man mulighet for å lage et ekstraksjonssystem som på en enkel, rask og selektiv måte kan isolere analytter fra små prøvevolumer. Metoden har vist seg å være godt egnet for ekstraksjon av biologisk matrikser uten krav til at prøvene behandles først[1,22].

2.2 Kapillærelektroforese (CE)

Kapillærelektroforese er en separasjonsteknikk som er basert på at ulike ladede stoffer vandrer med ulik hastighet i et elektrisk felt [25]. Oppsettet består av et tynt silikakapillær som er belagt med polyimid, en anode og en katode tilkoblet en høyspenningskilde, to beholdere med vandig buffer og en detektor, for eksempel en UV-detektor. En prinsippsskisse for kapillærelektroforese er vist i figur 2-2. I de tilfellene hvor det skal separeres basiske stoffer, må det velges en sur separasjonsbuffer med pH lavere enn pKa-verdien for de ulike stoffene. Analyttene må foreligge på ionisert form for at de skal kunne bevege seg i et elektrisk felt. Bufferen må ha en slik styrke at den holder pH konstant under hele CE-analysen. Separasjonsprosedyren starter med å injisere et lite volum av prøveløsningen inn i innløpet av kapillæret som er fylt med tilsvarende buffer som finnes i de to beholderne. Deretter føres de to endene av kapillæret ned i hver sin beholder med buffer hvor det også er plassert en elektrode. Er det basiske analytter som skal separeres er anoden plassert ved innløpet av kapillæret, mens katoden er plassert ved utløpet. Ved hjelp av spenningskilden settes det på høyspenning over de to elektrodene og analyttene vil begynne å migrere som en følge av at de frastøtes anoden og tiltrekkes katoden. De ulike stoffene vil vandre med ulik hastighet ut i fra forholdet mellom hvor mange ladninger de har og hvor stort molekylet er. Om et basisk molekyl har flere positive ladninger vil det i større grad trekkes mot katoden enn molekyler med færre positive ladninger. I tillegg til dette vil størrelsen på molekylet avgjøre i hvilken grad de møter motstand mot bevegelsen i væsken. Store molekyler møter større motstand enn små molekyler og vil derfor migrere saktere. Ved utløpet av kapillæret er det plassert en detektor som registrerer når de ulike analyttene passerer. UV-deteksjon skjer ved at UV-lys sendes på tvers av kapillæret og reduksjon i lyset plottes som funksjon av tid. Plottet som dannes kalles et elektroferogram og viser en topp for hvert av stoffene som ble analysert, samt migrasjonstiden for analyttene. Arealet av de ulike toppene kan

brukes til å kvantifisere stoffene fordi arealet er proporsjonalt med konsentrasjonen av analyttene i prøven. Migrasjonstiden kan brukes til å identifisere de ulike stoffene.



Figur 2-2 Prinsippkisse for kapillærelektroforese

2.3 LC-MS

I denne oppgaven ble analyser basert på væskechromatografi koblet med massespektrometrisk deteksjon i all hovedsak utført med LC-MS. Analyser av ekstrakter fra reelle prøver ble analysert med ultra performance liquid chromatography med tandem massespektrometri (UPLC-MS-MS) av analytikere ved FHI, divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning og har utover dette ikke vært en del av oppgaven.

Som navnet LC-MS hentyder består dette systemet i hovedsak av to deler. En prinsippkisse er vist i figur 2-3. Den væskechromatografiske delen (LC-delen) hvor separasjonen av analyttene skjer, består av et pumpesystem til å presse mobilfase med konstant hastighet inn på kolonnen [25], en injektor til å føre prøveløsningen inn i strømmen av mobilfase og en kolonne. I mange tilfeller er den stasjonære fasen i kolonnen av hydrofob karakter. Den er fremstilt ved å binde hydrofobe grupper til silanolgrupper på silika. Separasjonsprinsippet kalles omvendt-fase-kromatografi. De hydrofobe gruppene danner i ulik grad hydrofobe interaksjoner med analyttene i prøven og dette gir grunnlaget for separasjonen. Prøven transporteres inn på kolonnen med mobilfasen. Mobilfasen består av en blanding av vann og et eller flere organiske løsemidler som er blandbart med vann. Dette kan for eksempel være

metanol, acetonitrill eller tetrahydrofuran. Styrken på mobilfasen bestemmes av mengden og typen organisk løsemiddel. Økes innholdet, avtar retensjonen. For analytter med ioniserbare grupper er retensjonen på kolonnen også pH-avhengig. Dersom pH i mobilfasen er slik at ioniseringen fremmes, vil retensjonen avta.

Etter at mobilfase med prøveløsning har passert kolonnen går væskestrømmen inn i en ionekilde. I LC-MS er de to mest vanlige ioniseringsteknikkene elektroprayionisering (ESI) og kjemisk ionisering ved atmosfærisk trykk (APCI). Ionekilden sitter utenfor selve massespektrometeret og ioniseringen foregår under atmosfærisk trykk. Dette skyldes at dersom mobilfasen når vakuumsone i MS-systemet vil den fordampe som følge av det lave trykket. Dette vil i sin tur føre til at trykket inne massespektrometeret vil stige kraftig. Problemet kan løses ved flere tilnærminger. Ved å bruke en tørkegass kan man fjerne mye av mobilfasen, og ved å splitte strømmen av mobilfase vil kun en liten del av væskestrømmen gå inn i MS-systemet. Det brukes også pumper til å opprettholde vakuum inne i instrumentet. I denne oppgaven ble det benyttet ESI som ioniseringsteknikk og det er derfor denne som omtales videre.

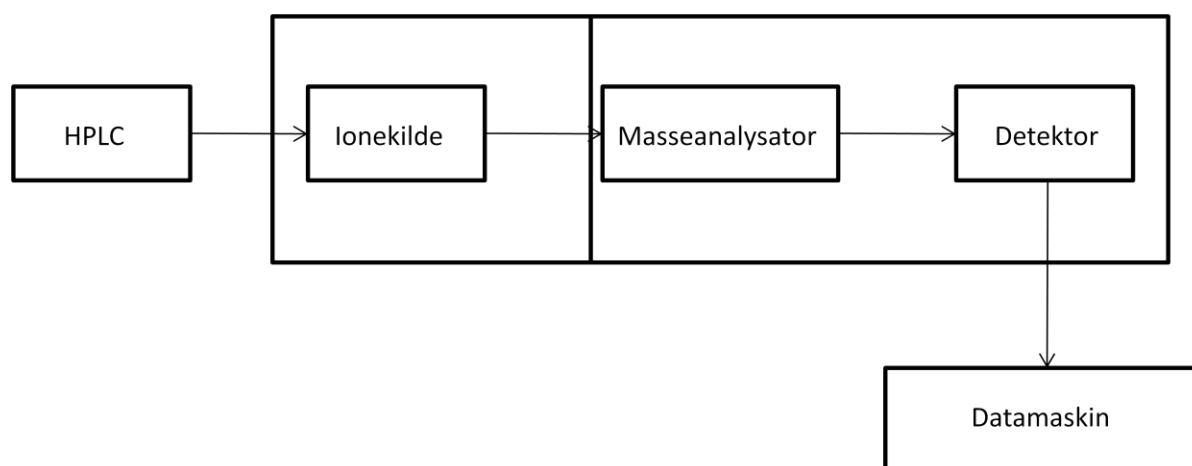
I ESI føres væskestrømmen med analyttene inn på et trangt kapillærrør. Væsken må være relativt flyktig slik at den kan fordampe. Ved utgangen av kapillærrøret vil væsken forstøves av nitrogengass og det dannes små dråper. En elektrode er plassert rett i nærheten av rørråpningen og mellom dem pålegges det et spenningspotensial som gjør at de små dråpene får ladning. Den fordampede væsken fjernes før masseanalysatoren med en tørkegass, mens analyttmolekylene som vil beholde sin ladning beveger seg videre inn i analysatoren ved hjelp av elektrisk spenning.

Massespektrometeret (MS-delen) består av en masseanalysator som separerer ioner etter forholdet mellom masse og ladning, og en detektor som registrerer mengden av de ulike ionene. Det finnes i dag flere typer masseanalysatorer, men kun kvadrupolprinsippet vil bli omtalt da dette er det anvendte prinsippet i denne oppgaven. Kvadrupolen består av fire sylindriske staver hvor av to er positivt ladet og to er negativt ladet. Ved å variere styrken på det elektriske feltet vil ioner med ulike masse/ladningsforhold (m/z -verdier) nå detektoren. Dersom et ion er ustabil i et gitt felt og treffer stavene vil det ikke gi noen detektorrespons. Som tidligere nevnt foregår dette under vakuum. Vakuomet er viktig for å unngå at ionene kolliderer med molekyler fra luft. Dette skal sikre at ionene når fram til detektoren. Resultatene fra analysen behandles elektronisk på en datamaskin og plottes i et

massespektrum. Massespekteret viser intensiteten av ionene i et stolpediagram som funksjon av masse/ladningsforholdet.

I LC-MS kan massespektrometeret opereres etter to forskjellige prinsipper. Det ene prinsippet går ut på at man tar opp massespektre ved gitte tidsintervaller, for eksempel hvert sekund, der masseanalysatoren separerer ut massene én etter én. Fordi stoffene oppholder seg svært kort tid i massespektrometeret må det tas opp massespektre med veldig korte mellomrom, typisk 1-5 spektre hvert sekund. Disse massespektrene lagres på en datamaskin og etter analysen plottes det et totalt ionestrømskromatogram. Dette kromatogrammet er et resultat av at intensiteten til alle registrerte ioner summeres for hvert massespektrum som tas opp under analysen og plottes som funksjon av tid. Det totale ionestrømskromatogrammet viser en topp for hvert av de separerte stoffene. Videre kan stoffene identifiseres og karakteriseres ved å undersøke deres tilhørende massespekter. Å ta opp spektre er mest aktuelt dersom man ønsker mye strukturinformasjon om stoffene, men ved å benytte dette prinsippet blir følsomheten begrenset og det kan derfor være vanskelig å detektere forbindelser med lave konsentrasjonsnivåer. Benytter man prinsippet som kalles selektiv ionemonitorering (SIM) under en LC-MS analyse er følsomheten høyere og man kan detektere analyttkonsentrasjoner på svært lave nivåer. Massespektrometeret innstilles da til kun å måle på én eller noen få bestemte masser kontinuerlig gjennom analysen. I kromatogrammet vil det da kun sees stoffer med den valgte massen.

Massespektrometri er en svært følsom deteksjonsmetode og stoffer helt ned på pikogramnivå kan detekteres. Lave konsentrasjonsnivåer og lite prøvemateriale er ofte tilfellet når biologiske matrikser som blod og urin skal analyseres. At LC-MS er en sensitiv analysemetode gjør den til en svært godt egnet teknikk innen felter som rusmiddelanalyse, dopinganalyse og legemiddelanalyse for terapikontroll.



Figur 2-3 Prinsippskisse for LC-MS

3. Eksperimentelt

3.1 Modellsustanser

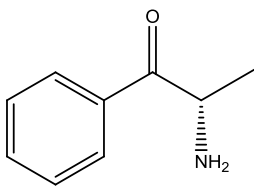
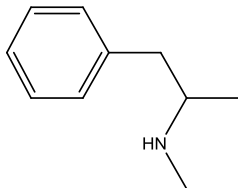
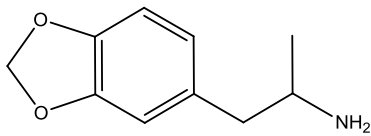
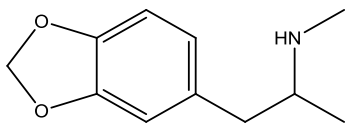
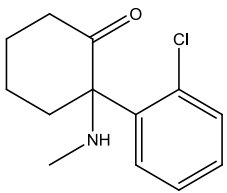
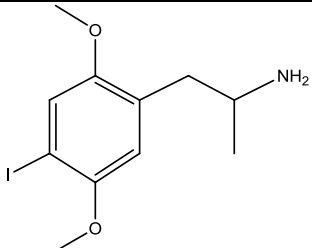
Tabell 3-1 viser navnene på modellsustansene og deres produsenter. Løsninger av stoffene ble gitt av FHI, divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning.

Tabell 3-1 Modellsustanser

Stoff	Produsent
Katinon	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
Metamfetamin	Lipomed GmbH, Weil am Rhein, Tyskland
MDA (3,4-metylendioksi-amfetamin)	Alltech, Deerfield, IL, USA
MDMA (3,4-metylendioksi-metamfetamin)	Cerilliant, Round Rock, TX, USA
Ketamin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
DOI (2,5-dimetoksi-4-iodamfetamin)	RBI, Natick, MA, USA

I tabell 3-2 er det vist en oversikt over parametre og strukturer for modellsustansene som ble brukt i oppgaven.

Tabell 3-2 Oversikt over kjemiske strukturer, pKa – og log P-verdier

Struktur	Navn	pKa-verdi	Log P-verdi
	Ketamin	8.0	0.9
	Metamfetamin	10.4	2.2
	MDA	9.9	1.6
	MDMA	10.3	2.1
	Ketamin	6.5	3.0
	DOI	9.5	2.6

Opplysningene og strukturene er hentet fra SciFinder Scolar.

Tabell 3-3 gir en oversikt over anvendte kjemikalier, deres kvalitet og leverandør.

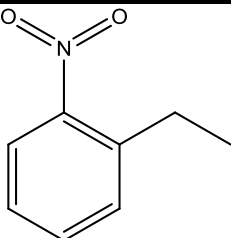
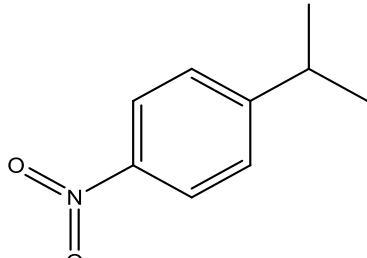
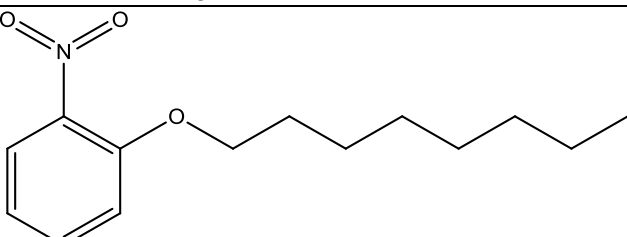
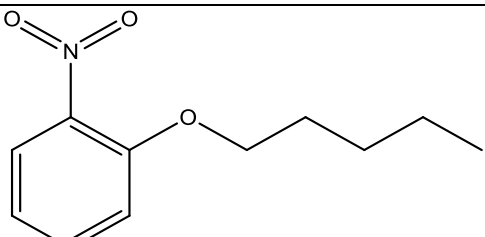
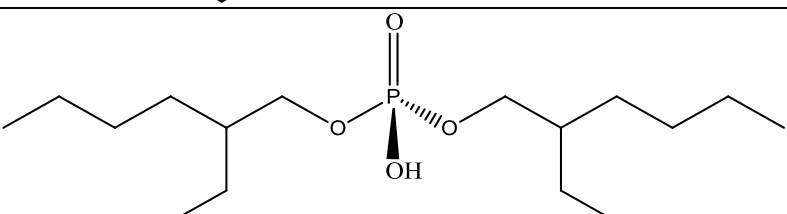
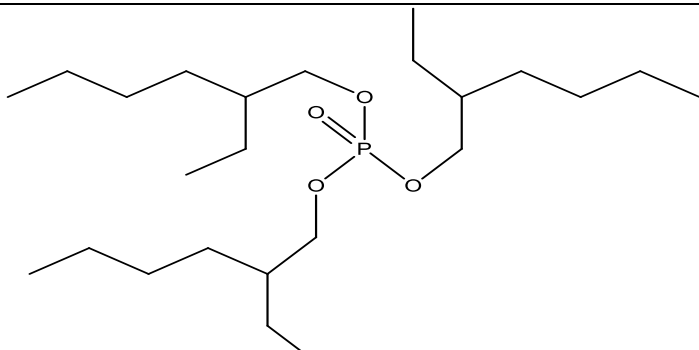
Tabell 3-3 Kjemikalier, kvalitet og leverandør

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
Di(2-etylheksyl)fosfat (DEHP)	Min. 95 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat- dodekahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12$ H_2O)	Pro analysi	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre (CH_3COOH)	Pro analysi 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
1-Etyl-2-nitrobenzen (ENB)	Purum, ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Sveits
Saltsyre (HCl)	Pro analysi 37 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
1-Isopropyl-4-nitrobenzen (IPNB)	97 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
Maursyre (HCOOH)	Pro analysi 98-100 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Metanol	Analytisk kvalitet	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland

Natriumacetat (CH_3COONa)	99 %	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat- monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Pro analysi	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid (NaOH)	Min. 98 %	Chemi-Teknikk AS, Oslo, Norge
2-Nitrofenyl-oktyleter (NPOE)	Selectophore	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Tyskland
2-Nitrofenyl-pentyleter (NPPE)	Selectophore	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Sveits
Orto-fosforsyre (H_3PO_4)	Pro analysi > 85 %	Merck KGaA, Darmstadt, Tyskland
Tris(2-etylheksyl)fosfat (TEHP)	Ukjent	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Sveits
Trifluoreddiksyre (TFA)	Ukjent	Ukjent

I tabell 3-4 er det en oversikt over strukturer og navn på organiske løsemidler og additiver som ble brukt i oppgaven.

Tabell 3-4 Oversikt over organiske løsemidler og additiver

Struktur	Navn
	ENB
	IPNB
	NPOE
	NPPE
	DEHP
	TEHP

Strukturene er hentet fra SciFinder Sclar.

3.2 Løsninger og buffere

3.2.1 Stamlløsninger

Ferdiglagde stamlløsninger av DOI, katinon, ketamin, MDA, MDMA (stamlløsning 1) og metamfetamin ble gitt av FHI, divisjon for retts toksikologi og rusmiddelforskning. Stoffene var løst og fortynnet i metanol til konsentrasjoner på henholdsvis 1.269 mg/ml, 0.939 mg/ml, 1.764 mg/ml, 0.182 mg/ml, 0.176 mg/ml og 1.008 mg/ml. Det ble også brukt en annen ferdiglaget stamlløsning av MDMA med konsentrasjon på 100 µg/ml i metanol (stamlløsning 2). Alle løsningene ble oppbevart beskyttet mot lys og i kjøleskap (4 °C).

3.2.2 Standardløsning

Standardløsningen med en konsentrasjon på 5 µg/ml, ble laget ved å pipettere ut 39.5 µl fra stamlløsningen med DOI, 53 µl fra stamlløsningen med katinon, 28.5 µl fra stamlløsningen med ketamin, 275 µl fra stamlløsningen med MDA, 284 µl fra stamlløsning 1 med MDMA og 49.5 µl fra stamlløsningen med metamfetamin over i en målekolbe, og fortynnet til 10 ml med 10 mM HCl. Løsningen ble oppbevart beskyttet mot lys og i kjøleskap (4 °C).

3.2.3 Donorfaser (prøveløsninger)

Blodprøve: 5 µg/ml

Prøveløsningen på 5 µg/ml ble laget ved at 31.5 µl av stamlløsningen med DOI, 42.5 µl fra stamlløsningen med katinon, 22.5 µl fra stamlløsningen med ketamin, 220 µl fra stamlløsningen med MDA, 227 µl fra stamlløsning 1 med MDMA og 39.5 µl fra stamlløsningen med metamfetamin ble pipettert ut, og blandet i et sentrifugerør (centerifuge tube, VWR International, West Chester, PA, USA). Deretter ble det tilsatt 7.4 ml humant, ufortynnet fullblod. Dette ble blandet på en vortexmixer (IKA[®] MS 3 digital, USA) i 30 sekunder.

Blodprøve: 2.5 µg/ml

Prøveløsningen på 2.5 µg/ml ble laget på tilsvarende måte som for prøveløsningen med 5 µg/ml, men med halvparten så store volumer av stamlløsningene. Mindre porsjoner på 2 ml av prøveløsningene på 2.5 µg/ml og 5 µg/ml ble pipettert over i eppendorfrør (Plastibrand Micro Tubes, Brand GmbH, Wertheim, Tyskland) og fryst ned (-32 °C). Ett og ett av disse

rørene ble tatt ut av fryseren og tint på lunkent vannbad i 5 minutter før de ble brukt i ulike forsøk.

Blodprøve: 5 µg/ml, tilsatt 0.2 M acetatbuffer med pH 4

For å lage denne prøveløsningen ble det først laget en acetatbuffer. Det ble gjort ved å pipettere ut 2.3 ml CH_3COOH som ble fortynnet med destillert vann til et totalvolum på 100 ml og en molaritet på 0.4 M. Deretter ble 3.28 g CH_3COONa veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 100 ml og en molaritet på 0.4 M. 41 ml av eddiksyreløsningen ble blandet med 9.0 ml av natriumacetatløsningen og fortynnet med destillert vann til et totalvolum på 100 ml. pH ble kontrollert med pH-papir (Merck, Darmstadt, Tyskland).

En blodprøve med konsentrasjon på 10 µg/ml ble laget ved at 31.5 µl av stamløsningen med DOI, 42,5 µl av stamløsningen med katinon, 22.5 µl av stamløsningen med ketamin, 220 µl fra stamløsningen med MDA, 400 µl av stamløsning 2 med MDMA og 39,5 µl av stamløsningen med metamfetamin ble pipettert over i et sentrifugerør (centerifuge tube, VWR International, West Chester, PA, USA). Deretter ble det tilsatt 3.25 ml humant, uforynnet fullblod. Dette ble blandet på vortexmixer (IKA[®] MS 3 digital, USA) i 30 sekunder.

0.5 ml av blodprøven og 0.5 ml av acetatbufferen ble pipettert over i et eppendorfrør (Plastibrand Micro Tubes, Brand GmbH, Wertheim, Tyskland) og blandet på vortexmixer (IKA[®] MS 3 digital, USA) i 30 sekunder.

Vandig prøve: 5 µg/ml, fosfatbuffer 0.1 M og pH 7.4

Fosfatbufferen ble laget ved først å veie ut 27.7 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ som ble løst i destillert vann til et volum på 1000 ml. Deretter ble 71.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ veid ut og løst i destillert vann til et volum på 1000 ml. 19 ml av NaH_2PO_4 -løsningen ble blandet med 81 ml av Na_2HPO_4 -løsningen og fortynnet med destillert vann til 200 ml. pH ble kontrollert med et pH-meter (Metrohm Ion Analysis, Herisau, Sveits). 15.8 µl av stamløsningen med DOI, 21.5 µl fra stamløsningen med katinon, 11.5 µl fra stamløsningen med ketamin, 110 µl fra stamløsningen med MDA, 200 µl fra stamløsning 2 med MDMA og 19.9 µl fra stamløsningen med metamfetamin ble pipettert over i et sentrifugerør (centerifuge tube, VWR International, West Chester, PA, USA) og tilsatt 3.6 ml fosfatbuffer. Dette ble blandet

på en vortexmixer (IKA[®] MS 3 digital, USA) i 30 sekunder. Løsningen ble oppbevart beskyttet mot lys og i kjøleskap (4 °C) til dagen etter.

Fortynningsrekke til linearitetsforsøk

Til dette forsøket ble det laget en fortynningsrekke bestående av seks blodprøver med konsentrasjoner på 500 ng/ml, 250 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml og 10 ng/ml. Først ble blodprøven med konsentrasjon på 500 ng/ml laget ved å pipettere ut 0.2 ml av standarden på 5 µg/ml, og ble deretter tilsatt 1.8 ml fullblod. De andre blodprøvene ble laget ved å fortynne ulike volumer fra blodprøven på 500 ng/ml med fullblod til de gitte konsentrasjonene. Alle prøvene ble blandet ved at hver enkelt prøve ble vendt opp og ned for hånd i 1 minutt.

Blodprøver til repeterbarhetsforsøk: 10 ng/ml, 50 ng/ml og 500 ng/ml

Fra fortynningsrekken som ble laget til linearitetsforsøket ble blodprøvene på 50 ng/ml og 500 ng/ml brukt videre i repeterbarhetsforsøket. Blodprøve på 10 ng/ml ble laget ved å pipettere 60 µl fra blodprøven med konsentrasjon på 50 ng/ml og tilsatt 240 µl fullblod.

3.2.4 Akseptorfaser

10 mM HCOOH

189 µl HCOOH ble pipettert ut og fortynnet med destillert vann til 500 ml.

10 mM CH₃COOH

286 µl CH₃COOH ble pipettert ut og fortynnet med destillert vann til 500 ml.

10 mM H₃PO₄

337 µl H₃PO₄ ble pipettert ut og fortynnet med destillert vann til 500 ml.

10 mM HCl

413 µl HCl ble pipettert ut og fortynnet med destillert vann til 500 ml.

10 mM TFA

77 ml av en 0.1 % TFA-løsning ble pipettert ut og fortynnet med destillert vann til 100 ml

3.2.5 Organiske faser

5 % DEHP i ENB

150 mg DEHP ble veid ut og blandet med 2.85 g ENB

5 % DEHP i NPOE

150 mg DEHP ble veid ut og blandet med 2.85 g NPOE.

5 % TEHP i NPOE

150 mg TEHP ble veid ut og blandet med 2.85 g NPOE.

I tillegg til disse ble det også gjort forsøk med IPNB, NPPE samt ren ENB og NPOE

3.2.6 Separasjonsbuffer

Fosfatbuffer pH 2.75

En 25 mM løsning av $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ble laget ved å veie ut 3.45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ og løst i destillert vann til et volum på 1000 ml. Deretter ble det laget en 25 mM løsning av 85 % (v/v) H_3PO_4 ved å pipettere ut 1.685 ml H_3PO_4 og fortynnet til 1000 ml med destillert vann. Løsningen av NaH_2PO_4 ble titrert ned med H_3PO_4 til pH 2.75. pH ble kontrollert med et pH-meter (Metrohm Ion Analysis, Herisau, Sveits). Bufferen ble til slutt filterert med et filter med porestørrelse på 0.45 μm (Ministar RC 25 singel use syringe filter, none sterile, Vivascience AG, Hannover, Tyskland).

3.2.7 Vaskeløsning

NaOH 0.1M

1 g NaOH ble veid ut og løst i destillert vann til et totalvolum på 250 ml.

3.2.8 Mobilfaser

0.377 ml konsentrert HCOOH i LC-MS-kvalitet ble fortynnet med ionebyttet vann til et totalvolum på 500 ml og en konsentrasjon på 20 mM. Mobilfase A ble laget ved å blande 475 ml av maursyreløsningen med 25 ml metanol. Mobilfase B ble laget ved å blande 25 ml av maursyreløsningen med 475 ml metanol. Begge mobilfasene ble satt på ultralydbad i 5 minutter.

3.3 Elektromembranekstraksjon

Oppsett og utstyr til EME i oppgaven er tidligere vist i figur 2-1. Den porøse polypropylenhulfiberen av typen PP Q3/2 som ble brukt til å immobilisere det organiske løsemiddelet med og som rommet akseptorfase, hadde en indre diameter på 0.6 mm, en veggtykkelse på 200 μm og en porestørrelse på 0.2 μm (Membrana GmbH, Wuppertal, Tyskland). Fiberen ble før forsøkene klippet i lengder på 5 cm. Denne lengden på fiberen var på forhånd testet ut til å romme 10 μl akseptorfase. Det ble deretter festet på 2 cm lange pipettespisser (Microloader 0.5-20 μl , Eppendorf AG, Hamburg, Tyskland) i hver ende til å lede inn akseptorfase og katode med. Platinaelektrodene som ble brukt hadde en diameter på 0.2 mm (K.A. Rasmussen, Hamar, Norge) og var enten koblet til et 9 V batteri (Duracell Procell, Bethel, USA) eller en strømkilde av merket ES 0300-0.45 (Delta Elektronika power supply, Zierikzee, Nederland) med regulerbar spenning (0-300 V) og strøm (0-450 mA). Strømkilden ble benyttet ved optimalisering av spenning i systemet, og ble basert på resultatene fra dette forsøket benyttet videre i resten av arbeidet.

80 μl donorfase ble overført til en vial (Chromacol LTD 500x0,1 CVG 613, Trumbull, CT, USA). Den organiske fasen ble immobilisert i hulfiberen ved å dyppe denne i løsemiddelet i 5 sekunder og overskuddet ble fjernet ved å tørke fiberen med en serviett. 10 μl av akseptorfase ble sprøytet inn i hulfiberlumen med en mikrolitersprøyte (Microliter syringe, Hamilton, Bonadus, Sveits). Hulfiberen ble deretter senket ned i donorfasen og elektrodene ble plassert i hver sin vandige fase. Anode i donorfase og katode i akseptorfase. Etter

ekstraksjonen var ferdig ble akseptorfasen tatt ut av hulfiberlumen med en mikrolitersprøyte (Microliter syringe, Hamilton, Bonadus, Sveits) og overført til en vial for analyse på CE eller LC-MS. I de tilfellene hvor ekstraktene ble analysert med LC-MS ble akseptorfasen fortynnet til 40 μ l med 10 mM CH₃COOH.

3.4 Beregning av utbytte og oppkonsentrering

Utbytter fra ekstraksjonene ble beregnet ved hjelp av følgende ligning:

$$R = \frac{n_a}{n_s} \times 100\% = \left(\frac{V_a}{V_s}\right) \left(\frac{C_a}{C_s}\right) \times 100\% \quad (3-1)$$

I ligning 3-1 er n_a et uttrykk for antall mol av analytten som er i akseptorfasen etter ekstraksjonen, og n_s er et uttrykk for antall mol av analytten som var i donorfase før ekstraksjonen. V_a og V_s er uttrykk for volumet av henholdsvis akseptorfasen og donorfase. C_a og C_s uttrykker konsentrasjonen av analytten i henholdsvis akseptor- og donorfase [15].

3.5 Betingelser for CE

CE-instrumentet som ble brukt til å analysere ekstraktene med var av typen Agilent Capillary Electrophoresis System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), og programmet som ble brukt til databehandling het Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Betingelsene for CE er gitt i tabell 3-5.

Tabell 3-5 Utstyr og betingelser for CE

Kapillær (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)	Fused silica, indre diameter: 75 µm, effektiv lengde: 55 cm
Separasjonsbuffer	25 mM fosfatbuffer med pH 2.75
Injeksjonstrykk og injeksjonstid	50.0 mbar i 5 sekunder
Spennning	30.0 kV
Strøm	50-100 mA
Bølgelengde for deteksjon	200 nm
Temperatur i kasett	20 ° C
Analysetid	10 minutter

Første gang et kapillær ble tatt i bruk ble det kondisjonert ved å spyle det med 100 mM NaOH i 30 minutter. Deretter ble det spylt i 5 minutter med vann og til slutt med separasjonsbuffer i 30 minutter. Etter at dette var gjort ble kapillæret på starten av hver dag

kondisjonert på tilsvarende måte, men da kun i 15 minutter med NaOH, 2 minutter med vann og 15 minutter med separasjonsbuffer. For å unngå forurensninger ble kapillæret vasket mellom hver analyse med 100 mM NaOH i 2 minutter og separasjonsbuffer i 2 minutter. I tillegg ble buffersettet skiftet ved hver åttende analyse. På slutten av hver dag ble kapillæret først vasket med vann i 2 minutter og deretter ble det blåst luft inn i 2 minutter. Dette ble gjort for at ikke det skulle felle ut salter fra separasjonsbufferen som kunne forurense kapillæret.

3.6 Betingelser for LC-MS

Bestanddelene i LC-MS er gitt i tabell 3-6. Det ble laget to mobilfaser ved LC-MS-analyse, mobilfase A og B. Mobilfase A bestod av 95 % 20 mM HCOOH og 5 % metanol, mens mobilfase B bestod av 5 % 20 mM HCOOH og 95 % metanol. Flow-hastigheten på mobilfasen var på 50 μ l/minutt og injeksjonsvolumet var på 20 μ l. Et gradientprogram ble satt opp der det fra 0 til 12 minutter økte lineært fra 0 % til 15 % med mobilfase B. Fra 12 til 20 minutter økte andelen av mobilfase B lineært fra 15 til 100 %. Deretter ble kolonnen vasket med 100 % mobilfase B i 2 minutter, før det avslutningsvis ble vasket med 100 % mobilfase A i 5 minutter. For å identifisere de ulike analyttene ble det innledningsvis gjort analyser på en standard med en konsentrasjon på 500 ng/ml. Masseanalysatoren ble da operert til å separere ut massene én etter én, og ved hjelp av kromatogram og tilhørende massespektre ble retensjonstidene bestemt. Da dette var klarlagt ble prøveekstrakter analysert i SIM-modus på m/z -verdiene 150 (katinon og metamfetamin), 180 (MDA), 194 (MDMA), 238 (ketamin) og 322 (DOI). Det ble brukt ESI i positiv ioniseringsmodus. Nitrogen ble brukt som tørke- og forstøvergass. Tørkegassen ble levert med en hastighet på mellom 10-20 l/minutt og forstøvergassen på 1.5 l/minutt. Blokktemperaturen var 200 °C og kapillærspenningen var på 4.5 kV.

Tabell 3-6 Bestanddeler i LC-MS

Komponent	Type	Produsent
Kolonne	Biobasic C8, lengde: 50 mm, indre diameter: 1 mm, partikkelstørrelse: 5 μ m	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pumpe	LC-10ADvp	Shimadzu, Kyoto, Japan
Degasser	DGU-14A	Shimadzu, Kyoto, Japan
Autosampler	SIL-10Aadv	Shimadzu, Kyoto, Japan
Detektor	LC-MS-2010 A	Shimadzu, Kyoto, Japan
System kontrollenhet	SCL-10Avp	Shimadzu, Kyoto, Japan
Massespektrometer	LC-MS 2010	Shimadzu, Kyoto, Japan
Databehandlingsprogram	LCMS solutions v. 2.04	Shimadzu, Kyoto, Japan

3.7 Betingelser for UPLC-MS-MS

Analyser av ekstraktene fra de reelle prøvene ble utført på FHI, divisjon for retts toksikologi og rusmiddelforskning. Der ble det brukt et UPLC-instrument (Waters Acquity, Milford, MA, USA) med en HSS T3-kolonne (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Kolonnen hadde en indre diameter på 2.1 mm, en lengde på 100 mm og en partikkelstørrelse på 1,8 μ m. Mobilfase A var 100 % metanol og mobilfase B var 10 mM ammoniumformatbuffer med pH 3.1. Flowhastigheten var på 0.5 ml/minutt. Før analyser på UPLC-MS-MS ble alle ekstrakter fortynnet med 40 μ l av en blanding som bestod av 10 % metanol og 90 % vann. Hver analyse varte i 5.5 minutter og hadde en gradient som vist i tabell 3-7. Alle endringer i gradienten var lineære. Kolonnetemperaturen var 65 °C og injeksjonsvolumet var på 2 μ l.

Tabell 3-7 Gradientprogram

Tid (minutter)	Metanol (%)	Ammoniumformatbuffer (%)
0.0 – 0.5	10	90
0.5 – 1.5	30	70
1.5 – 2.5	30	70
2.5 – 2.6	60	40
2.6 – 3.0	90	10
3.0 – 4.2	90	10
4.3 – 5.5	10	90

Massespektrometeret var et Quattro Premier XE tandem massespektrometer (Waters Corporation, Milford, MA, USA) med Z-spray elektroprayonisering. Det ble brukt positiv ionisering og én MRM-overgang for hvert stoff. m/z -verdiene for utgangsjonene i MRM-overgangene var 149.9 (katinon og metamfetamin), 160.9 (metamfetamin d11), 179.9 (MDA), 193.9 (MDMA), 198.9 (MDMA d5) og 238.1 (ketamin). For produksjonene ble det målt på m/z -veridene 91 (metamfetamin), 97 (metamfetamin d11), 105 (katinon), 163 (MDA og MDMA), 165 (MDMA d5) og 207.1 (ketamin). Kapillærspenning var på 1 kV og ionekildetemperaturen var på 120 °C. Nitrogen ble brukt som desolveringsgass og denne ble varmet opp til 500 °C. Desolveringsgassen ble levert med en hastighet på 900 l/time. Cone-gassen som også var nitrogen ble satt til 60 l/time. Argon ble brukt som kollisjonsgass og ga et trykk på 0,004 mbar.

4. Resultater og diskusjon

EME av de valgte modellsubstansene fra ubehandlet fullblod i et stillestående system er ikke tidligere blitt gjort. Av den grunn har arbeidet i denne oppgaven hatt som mål å optimalisere de ulike betingelsene og parametrene i EME-systemet med hensyn på best mulig ekstraksjonsutbytte for nettopp disse modellsubstansene. Resultatene fra optimaliseringen er videre blitt validert for å undersøke om EME er en egnet prøveopparbeidelsesmetode for å isolere og oppkonsentrere de gitte substansene fra fullblod. Under optimaliseringen ble analysene av ekstraktene gjort med CE og under valideringen med LC-MS. Avslutningsvis ble det optimaliserte EME-systemet testet ut på reelle prøver. Tre av prøvene bestod av likblod. Denne matriksen har ikke tidligere blitt testet i noe EME-system og det var antatt at matriksen var svært utfordrende å ekstrahere fra.

4.1 Optimalisering av organisk fase

Alle ekstraksjonene i forsøket ble gjort ved å ekstrahere 80 µl fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 µg/ml. Hulfiberen ble fylt med 10 µl 10 mM HCl som akseptorfase og en spenning på 9 V ble satt på i systemet. Ekstraksjonstiden var på 5 minutter.

I første del av optimaliseringen av organisk fase for ekstraksjonssystemet, ble de fire nitroaromatiske forbindelsene 1-etyl-2-nitrobenzen (ENB), 1-isopropyl-4-nitrobenzen (IPNB), 2-nitrofenyl-oktyleter (NPOE) og 2-nitrofenyl-pentyleter (NPPE) testet ut med hensyn på ekstraksjonsutbytte. Av disse fire var det ENB som ga det beste resultatet (jfr. Tabell 4-1). Basert på tidligere forsøk gjort for å øke utbyttet av stoffer med en helt eller delvis polar karakter, ble ENB og NPOE tilsatt en ionpardanner [16]. I denne delen av forsøket ble først ENB og NPOE tilsatt DEHP til en konsentrasjon på 5 %. Som det går fram av tabell 4-1 ga ikke dette noen resultater med ENB. Med 5 % DEHP i NPOE økte derimot utbyttet noe for katinon, metamfetamin, MDA og MDMA sammenlignet med ren NPOE, mens utbyttet for de mest upolare stoffene ketamin og DOI henholdsvis ble redusert eller uteble. I siste del av forsøket ble NPOE tilsatt 5 % tris(2-etylheksyl)fosfat (TEHP) for å se om dette kunne øke utbyttene for de mer upolare stoffene, men som vist i tabell 4-1 ga ikke dette detekterbare resultater. Fordi tilsetning av DEHP og TEHP ikke ga bedre utbytter enn det som var blitt oppnådd med ENB, ble denne organiske fasen valgt til videre arbeid. En

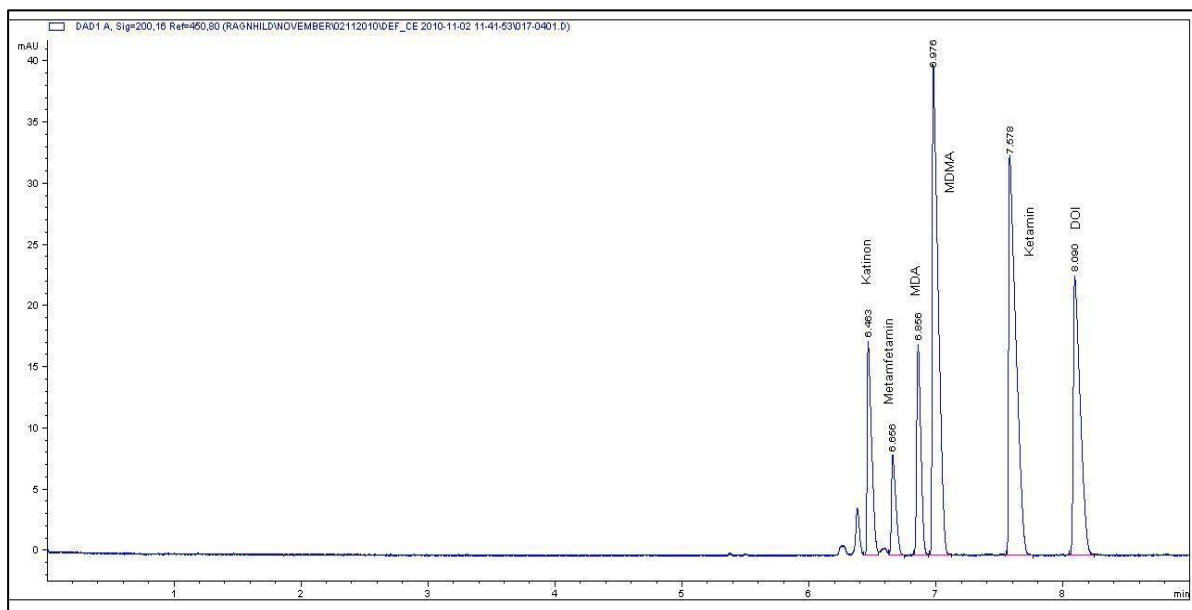
mulig forklaring på at tilsetning av DEHP ikke ga bedre utbytter enn det som ble vist, kan være at pH i akseptorfasen ikke var lav nok. Det må være tilstrekkelig med protoner i denne fasen for at analyttene skal frigjøres fra ionpaddanneren.

Det har tidligere blitt vist at det å ekstrahere direkte fra ubehandlet fullblod og plasma mens systemet ristes kan være problematisk da plasma har emulgerende egenskaper som gjør at væskemembranen over tid kan bli ustabil og punktere [1]. Dette vil i sin tur medføre redusert motstand mellom elektrodene, noe som innebærer en økning av strøm som går i systemet. En fordel ved at man har et stillestående system er at sjansen for at membranen går i stykker som en følge av plasmas emulgerende egenskaper er mindre. I et tidligere forsøk der det ble ekstrahert fra ubehandlet plasma i et stillestående EME-system, ble det vist at ENB var av de organiske løsemidlene som ga best utbytte [22], og disse erfaringene støttet opp om valget av organisk løsemiddel til væskemembranen i denne oppgaven. Figur 4-1 viser et elektroferogram der ENB er brukt som organisk fase. Som vist i denne figuren er ekstraktet forholdsvis rent, bortsett i fra to små forurensninger først i elektroferogrammet. Disse stammer sannsynligvis fra det organiske løsemiddelet.

Tabell 4-1 Utbytte fra fullblod med ulike organiske faser.

Organisk fase	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
ENB	12 %	14 %	7 %	15 %	25 %	16 %
IPNB	7 %	-	-	3 %	25 %	5 %
NPOE	3 %	2 %	1 %	1 %	13 %	1 %
NPPE	4 %	11 %	2 %	11 %	15 %	10 %
5 % DEHP i ENB	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5 % DEHP i NPOE	7 %	7 %	2 %	5 %	8 %	ND
5 % TEHP i NPOE	ND	ND	ND	ND	ND	ND

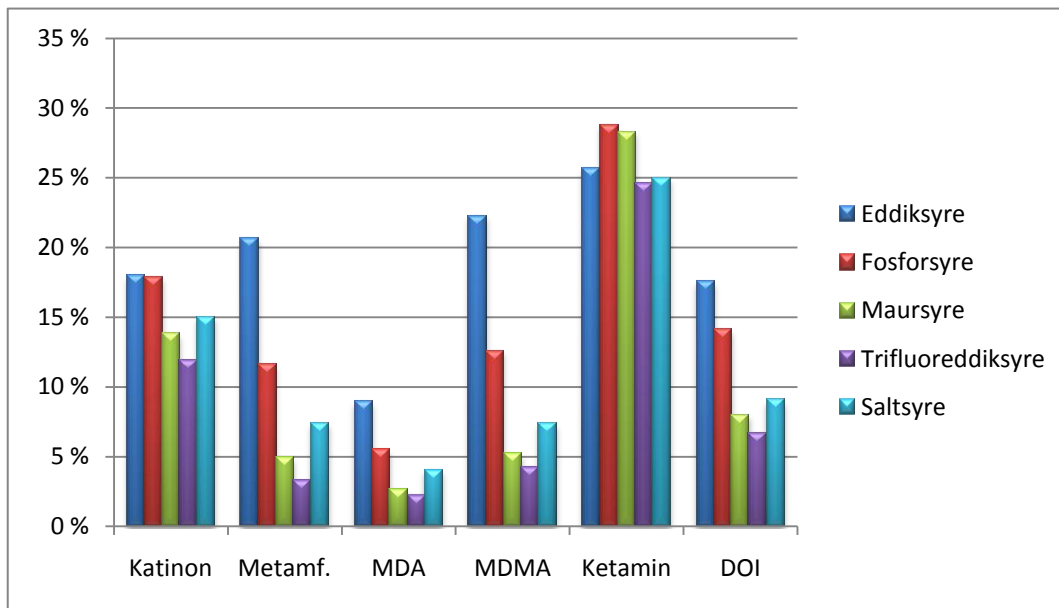
ND = ikke detektert, - = under deteksjonsgrensen. n=3



Figur 4-1 Elektroferogram fra ekstraksjon med ENB som organisk fase. Donorfase: fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 µg/ml, akseptorfase: 10 µl 10 mM HCl, organisk fase: ENB, spenning: 9V, ekstraksjonstid: 5 minutter.

4.2 Optimalisering av akseptorfaser

I denne delen av arbeidet ble fem ulike syrer prøvd ut som akseptorfaser i ekstraksjonssystemet. Det var ønskelig å se hvordan de ulike syrene påvirket utbyttet fra ekstraksjonene uten å endre på pH eller ionestyrke i akseptorfase, og samtidig finne et alternativ som var kompatibelt med analyser på LC-MS. Som det går fram av figur 4-2 var eddiksyre og fosforsyre de to syrene som ga høyest ekstraksjonsutbytte. Av disse to var det eddiksyre som ga det høyest utbyttet for metamfetamin, MDA og MDMA, mens utbyttet for ketamin var høyest med fosforsyre. For katinon var utbyttet i snitt det samme med eddiksyre og fosforsyre. Selv om eddiksyre ga noe høyere utbytte for flere av stoffene sammenlignet med fosforsyre, var ikke forskjellene ved bruk av de to syrene signifikante på 95 % konfidensnivå. På grunnlag av at eddiksyre er kompatibelt med LC-MS ble denne syren valgt som akseptorfase for ekstraksjonssystemet i oppgaven.



Figur 4-2 Utbytte fra fullblod med 10 μ l 10 mM av ulike akseptorfaser. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, organisk fase: ENB, spenning: 9 V, ekstraksjonstid: 5 minutter. n=3

4.3 Optimalisering av donorfase

Ekstraksjoner med rent fullblod som donorfase ble sammenlignet med ekstraksjoner hvor donorfasen bestod av fullblod tilsatt 0.2 M acetatbuffer med pH 4. Hensikten med å tilsette acetatbuffer var å redusere proteinbinding og kontrollere ioniseringen av analyttene. Enkelte av de basiske analyttene hadde pKa-verdier som lå nær den fysiologiske pH-verdien på 7.4, og var dermed ikke ladet eller kun delvis ladet. For å sikre fullstendig ionisering av analyttene ble donorfasen surgjort med buffer for teoretisk sett å øke utbyttet.

Ved å tilsette acetatbuffer ble blodprøven også fortynnet og dermed mindre viskøs. Viskositeten er av betydning for ekstraksjonskinetikken. I prøver med relativt høy viskositet går ekstraksjonskinetikken saktere, noe som medfører lavere utbytte når det ikke ekstraheres til steady state. Dette er tidligere også vist i forsøk hvor ekstraksjonskinetikken for fosfatbuffer med pH 7.4 er sammenlignet med ekstraksjonskinetikken for ubehandlet fullblod og plasma [1]

Begge donorfasene ble tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml. Av tabell 4-2 går det fram at fullblod tilsatt acetatbuffer ikke ga bedre ekstraksjonsutbytte enn rent fullblod, og av den grunn ble videre arbeid gjort med rent fullblod.

Tabell 4-2 Utbytte fra 80 µl fullblod og 80 µl fullblod tilsatt acetatbuffer med pH 4.

Donorfase	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
Fullblod	12 %	6 %	4 %	6 %	22 %	8 %
Fullblod tilsatt acetatbuffer	-	-	-	-	8 %	2 %

Begge donorfaser ble tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 µg/ml. Akseptorfase: 10 µl 10 mM CH₃COOH, organisk fase: ENB, spenning: 9 V, ekstraksjonstid: 5 minutter. - = under deteksjonsgrensen, n=3

4.4 Optimalisering av spenning

I det innledende forsøket med optimalisering av spenning for ekstraksjonssystemet ble det sett på utbytte ved 1, 5, 10, 15, 25 og 50 V. Resultatene er vist i tabell 4-3. For å undersøke om det var noen signifikante forskjeller ble resultatene fra ekstraksjonene ved 1 V sammenlignet med resultatene fra 15 V og 50 V. Forskjellene i utbytte mellom 1 V og 15 V var kun signifikant for ketamin på 95 % konfidensnivå. Mellom 1 V og 50 V var forskjellene i utbytte signifikante på 95 % konfidensnivå for ketamin og MDA. Basert på at resultatene fra forsøket ikke viste noen klare forskjeller i ekstraksjonsutbytte ved de ulike spenningene, ble 15 V valgt for videre forsøk. Denne beslutningen var også basert på tidligere forskning som har vist at det ikke oppnås høyere utbytte ved å øke spenningen over et visst punkt med ENB som organisk fase [1,19,22].

I denne oppgaven har det vært fokus på å optimalisere ekstraksjonssystemet på et lavt spenningsnivå og av den grunn har ikke spenning over 50 V vært testet ut. Det bør imidlertid tas med i betraktningen at dersom spenningen hadde blitt økt ytterligere og om man hadde benyttet et annet organisk løsemiddel i væskemembranen er det mulig at utbyttet kunne vært høyere. Denne betraktningen er basert på at det i tidligere EME-forsøk har blitt oppnådd utbytte på mellom 16-78 % for basiske substanser ved å legge på et spenningspotensial på 300 V og benytte NPOE som organisk fase [16].

Tabell 4-3 Utbytte ved ulike spenninger.

Spenning (V)	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
1	20 %	16 %	8 %	16 %	34 %	18 %
5	10 %	12 %	4 %	12 %	22 %	10 %
10	10 %	13 %	6 %	13 %	20 %	11 %
15	11 %	19 %	8 %	17 %	21 %	13 %
25	11 %	17 %	9 %	16 %	18 %	11 %
50	16 %	20 %	13 %	19 %	20 %	14 %

Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml,
akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH₃COOH, organisk fase: ENB, ekstraksjonstid: 5
minutter. n=3

Det ble også utført et forsøk hvor det ble sett på utbytte ved 0, 1 og 5 V. Dette ble gjort for å sammenligne utbyttet oppnådd ved passiv diffusjon med utbyttet oppnådd ved å tilføre systemet et spenningspotensial. Som det går fram av tabell 4-4 ble det oppnådd relativt godt utbytte i et ekstraksjonssystem uten spenning som drivkraft. Dette antas å ha en sammenheng med at ved fysiologisk pH er noen av analyttene kun delvis ladet eller ikke ladet i det hele tatt, og vil derfor diffundere lettere inn i den organiske fasen enn om de hadde vært fullstendig ladet. At utbytte øker noe ved 1 V og 5 V sammenlignet med 0 V skyldes at spenningen antas å øke hastigheten på transporten av analytter ut av den organiske fasen og inn i akseptorfasen.

Tabell 4-4 Utbytte ved ulike spenninger.

Spenning (V)	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
0	12 %	5 %	3 %	8 %	21 %	10 %
1	17 %	7 %	5 %	11 %	26 %	15 %
5	14 %	15 %	6 %	21 %	21 %	17 %

Donorfase: 80 µl fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 µg/ml, akseptorfase: 10 µl 10 mM CH₃COOH, organisk fase: ENB, ekstraksjonstid: 5 minutter. n=3

I et tredje forsøk ble utbytte ved 0, 5 og 15 V fra fullblod sammenlignet med utbytte oppnådd ved samme spenninger fra 0.1 M fosfatbuffer med pH 7.4. Denne pH-verdien ble valgt for at betingelsene for ekstraksjoner fra fosfatbuffer skulle være mest mulig like betingelsene for ekstraksjoner fra ubehandlet fullblod. Hensikten med dette forsøket var å undersøke om det var elementer i blodet som forsinket eller hemmet ekstraksjonen av analytter. Resultatene av ekstraksjonene er vist i tabell 4-5 og 4-6 og av disse går det fram at utbyttet fra fullblod var lavere enn utbyttet fra fosfatbuffer. Som tidligere nevnt gjør blodets relativt høye viskositet sammenlignet med fosfatbuffer at analyttene ekstraheres saktere noe som gir lavere utbytte når man ikke ekstraherer til steady state. En annen faktor som bidrar til at ekstraksjonen av analyttene fra ubehandlet fullblod går saktere er at analyttene er proteinbundet i blodet. At analyttene er bundet til proteiner medfører at ekstraksjonen av disse undertrykkes [19].

Tabell 4-5 Utbytte ved 0, 5 og 15V fra fullblod.

Spenning (V)	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
0	11 %	4 %	2 %	4 %	24 %	10 %
5	12 %	10 %	4 %	14 %	25 %	19 %
15	15 %	16 %	9 %	22 %	28 %	26 %

Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH₃COOH, organisk fase: ENB, ekstraksjonstid: 5 minutter. n=3

Tabell 4-6 Utbytte ved 0, 5 og 15V fra fosfatbuffer.

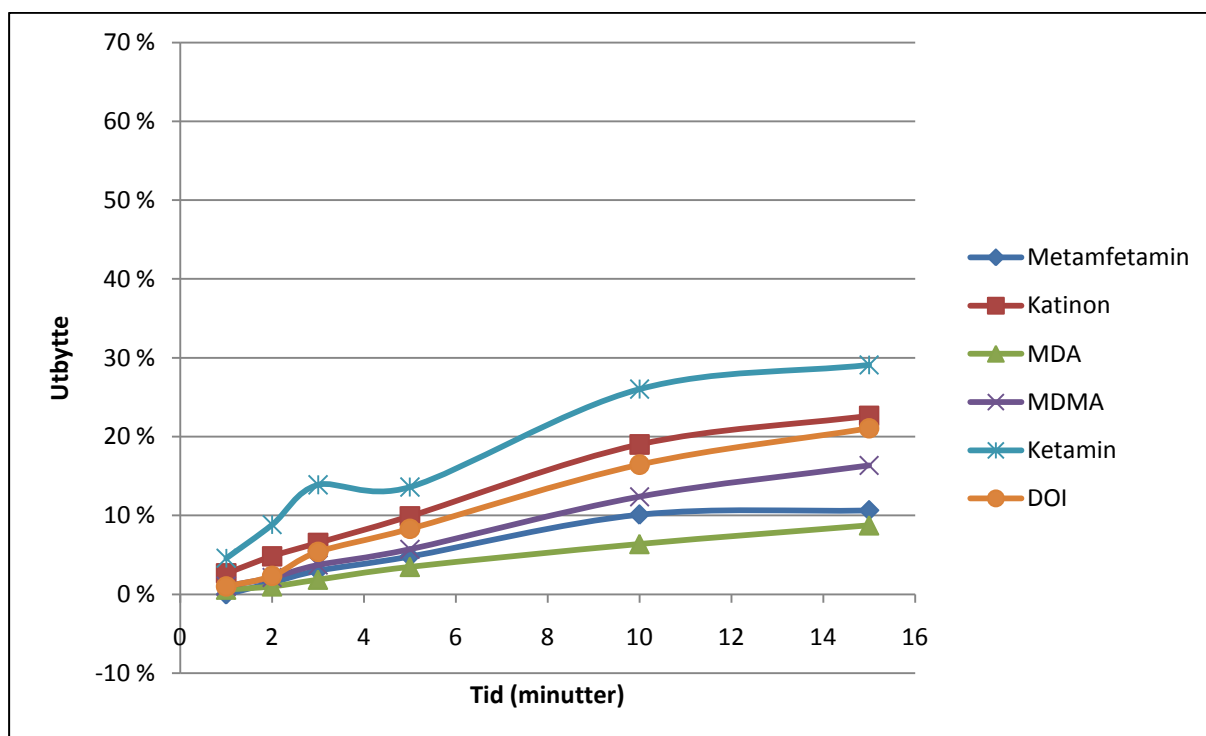
Spenning (V)	Utbytte (%)					
	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
0	17 %	5 %	4 %	9 %	28 %	26 %
5	17 %	18 %	8 %	27 %	30 %	51 %
15	22 %	31 %	17 %	41 %	32 %	67 %

Donorfase: 80 μ l 0,1 M fosfatbuffer pH 7,4 tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH₃COOH, organisk fase: ENB, ekstraksjonstid: 5 minutter. n=3

4.5 Optimalisering av ekstraksjonstid

I siste del av optimaliseringen av ekstraksjonssystemet ble det sett på utbytte etter 1, 2, 3, 5, 10 og 15 minutter ekstraksjonstid. Forsøket ble først gjort en gang uten at det ble satt på et spenningspotensial. Deretter ble forsøket gjentatt der ekstraksjonene foregikk med et spenningspotensial på 15 V over væskemembranen.

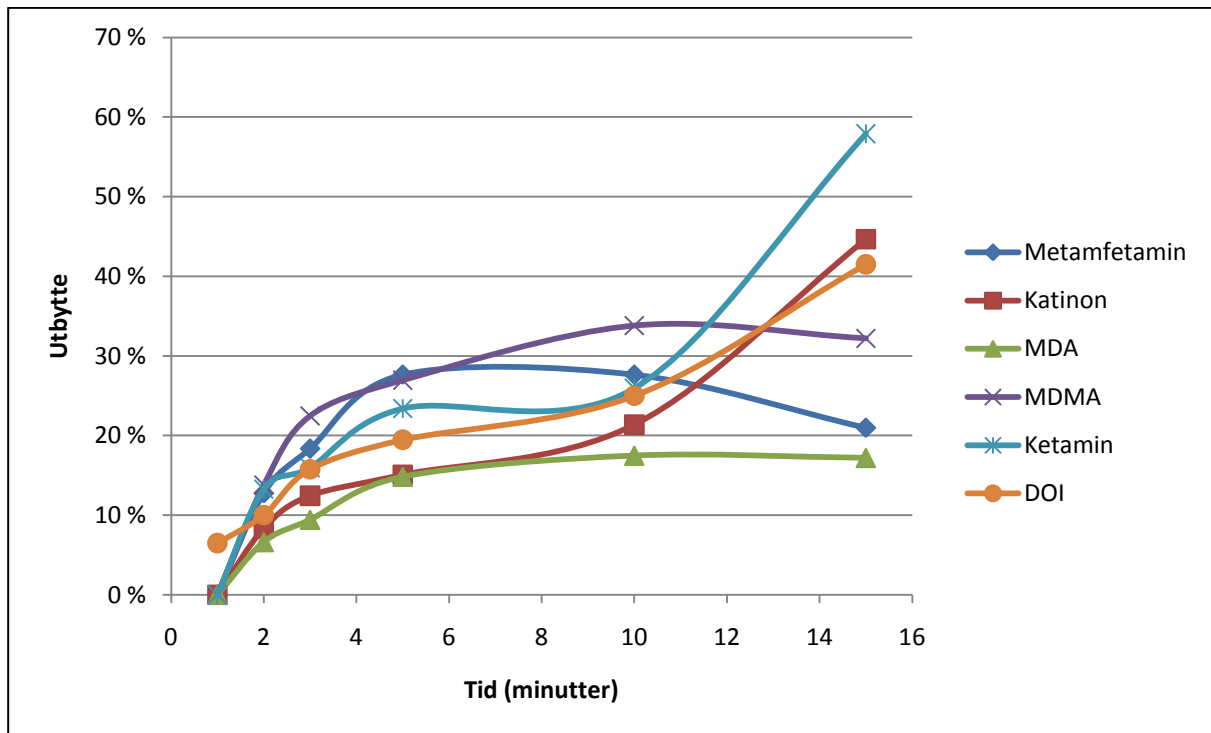
Figur 4-3 viser utbytte som funksjon av tid ved 0 V. Av denne figuren går det fram at utbytte for alle analyttene øker relativt jevn med tiden. Drivkraften i dette systemet er passiv diffusjon og grunnen til at det ble oppnådd utbytte uten at det ble satt på spenning er sannsynligvis en kombinasjon av at stoffene som tidligere nevnt ikke er ladet eller kun delvis ladet ved fysiologisk pH, og at de er relativt hydrofobe. Dette gjør at de vil fordeles over i væskemembranen. Som en følge av at det er en konsentrasjonsgradient mellom donor- og akseptorfase vil analyttene diffundere mot akseptorfase.



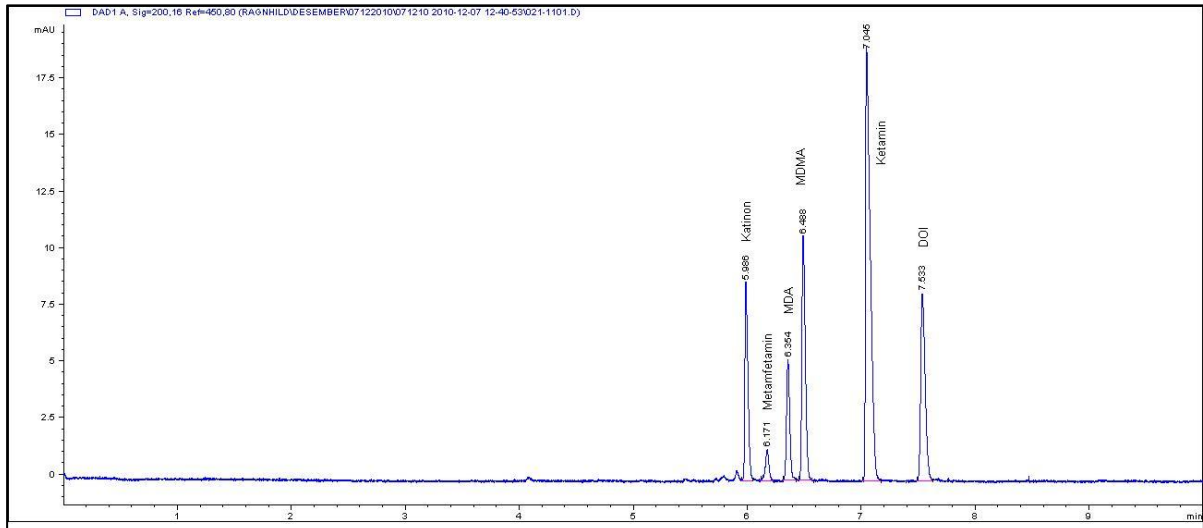
Figur 4-3 Utbytte ved ulike tidspunkter. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 0 V.

Figur 4-4 viser utbytte som funksjon av tid ved 15 V. I dette forsøket ble det besluttet å halvere konsentrasjonen av analytter til 2,5 μ g/ml i donorfase. Dette ble gjort da resultatene fra de første ekstraksjonene hvor konsentrasjonen av analytter i donorfase var på 5 μ g/ml så ut til å overbelaste ekstraksjonssystemet. Som figur 4-4 viser økte utbytte forholdsvis raskt

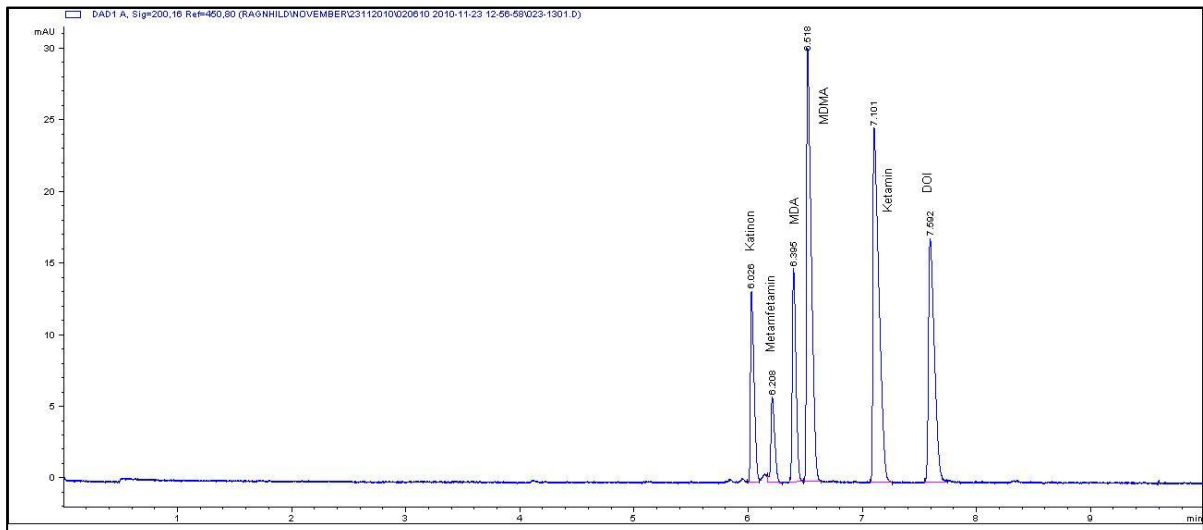
opp til 5 minutter før nivåene flater ut. For ketamin, katinon og DOI økte utbyttet igjen etter 10 minutter. Årsaken til dette er ikke klarlagt, men kan komme som en følge av proteinbinding i blodet. Som tidligere nevnt vil proteinbinding gjøre at ekstraksjonen av analyttene går tregere. Av figur 4-4 går det fram at flere av stoffene når steady state etter ca. 5 minutter. Basert på denne observasjonen og at det var ønskelig med kort ekstraksjonstid ble det valgt å ekstrahere i 5 minutter i senere forsøk. Figur 4-5 og 4-6 viser elektroferogrammer fra ekstraksjoner utført ved henholdsvis 0 V og 15 V i 5 minutter.



Figur 4-4 Utbytte ved ulike tidspunkter. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon 2,5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 15 V. n=3



Figur 4-5 Elektroferogram fra ekstraksjon utført med 0 V i 5 minutter. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB.



Figur 4-6 Elektroferogram fra ekstraksjon utført med 15 V i 5 minutter. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon 2,5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB.

4.6 Validering

For å undersøke om ekstraksjonsprosessen var egnet til det formålet den skulle brukes til ble det gjort en delvis validering. Valideringsparametre som ble testet var deteksjonsgrense, linearitet og repeterbarhet.

4.6.1 Deteksjonsgrense

Denne parameteren angir den laveste konsentrasjonen av stoff som med sikkerhet kan detekteres i prøven med den aktuelle analysemetoden. Dette betegnes som en grensetest som sier at en analytt kan påvises hvis konsentrasjonen i aktuell prøve er større enn eller lik deteksjonsgrensen [25]. I denne oppgaven er deteksjonsgrensen definert som S/N (signal-to-noise forhold) lik 3. FHI, divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning anslo relevant konsentrasjonsområde for analyttene på mellom 40-65 ng/ml. Deteksjonsgrensene for analyttene er gitt i tabell 4-7 og resultatene var tilfredsstillende i forhold til nedre verdi av oppgitt konsentrasjonsområde.

4.6.2 Linearitet

Lineariteten til en metode testes ved å se hvorvidt kalibreringskurvene viser responsen som en lineær funksjon av konsentrasjonen innenfor et gitt konsentrasjonsområde. Dette gjøres ved å regne ut en regresjonslinje og en regresjonskoeffisient. Denne koeffisienten bør helst ha en verdi på 0.999 [25]. I oppgaven er det benyttet fem konsentrasjonsnivåer: 10, 25, 50, 100 og 250 ng/ml. I utgangspunktet var det også med et sjette konsentrasjonsnivå på 500 ng/ml, men dette punktet ble utelatt fra resultatene fordi det viste seg at responsen som funksjon av konsentrasjon ikke var lineær på dette nivået. Konsentrasjonsområdet som ble valgt var basert på de tidligere nevnte verdiene oppgitt av FHI. For hvert konsentrasjonsnivå ble det gjort tre paralleller. Regresjonskoeffisienten for alle analytter i prøvene er gitt i tabell 4-7 og resultatet var tilfredsstillende i det gitte konsentrasjonsområdet.

4.6.3 Repeterbarhet

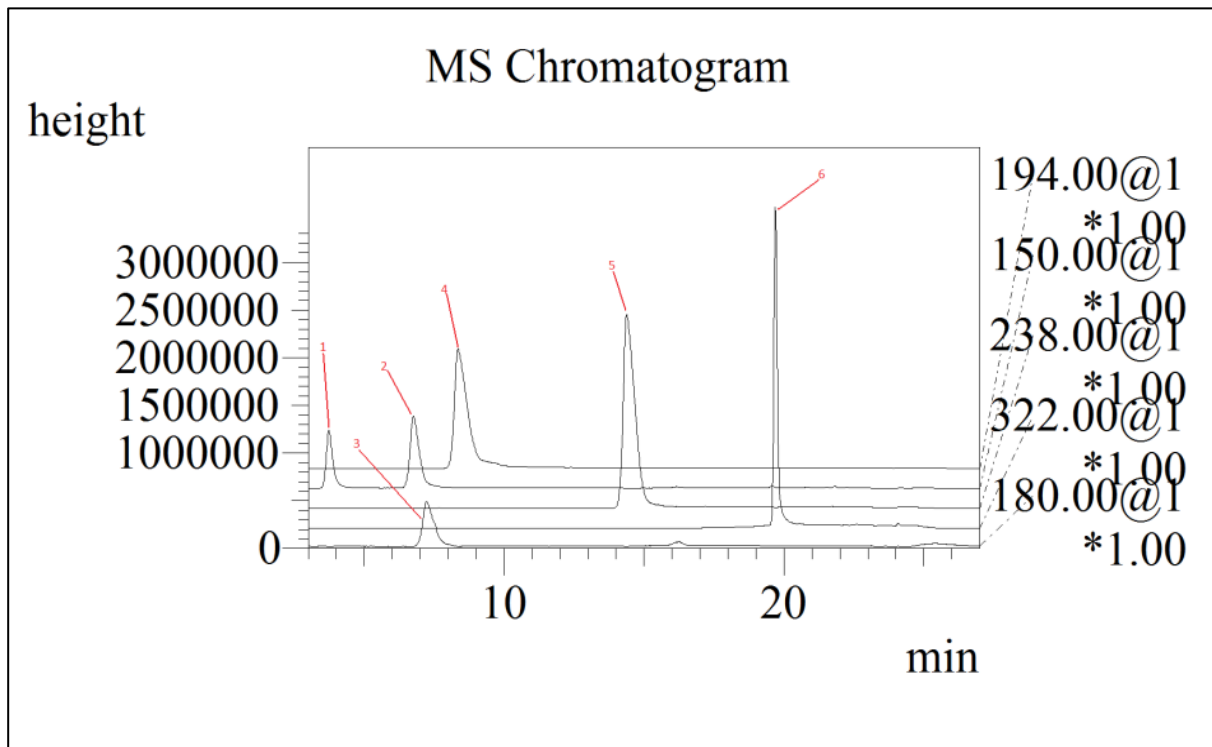
Repeterbarheten er en parameter som sier noe om spredningen i analyseresultatene. Denne bestemmes som relativt standardavvik etter gjentatte analyser under identiske betingelser over en kort tidsperiode [25]. De tre konsentrasjonsnivåene som ble valgt var 10, 50 og 500 ng/ml. På hvert nivå ble det gjort seks paralleller. Repeterbarheten oppgitt i prosent relativt

standardavvik for alle analytter på de ulike konsentrasjonsnivåene er gitt i tabell 4-7. Som det går fram av tabellen er flere av standardavvikene relativt høye. Dette var ventet som en følge av at det ble ekstrahert med veldig små volumer og av den grunn ble standardavvikene ansett for å være på et tilfredsstillende nivå. Figur 4-7, 4-8 og 4-9 viser kromatogrammer fra ekstraksjoner med henholdsvis 500 ng/ml, 50 ng/ml og 10 ng/ml.

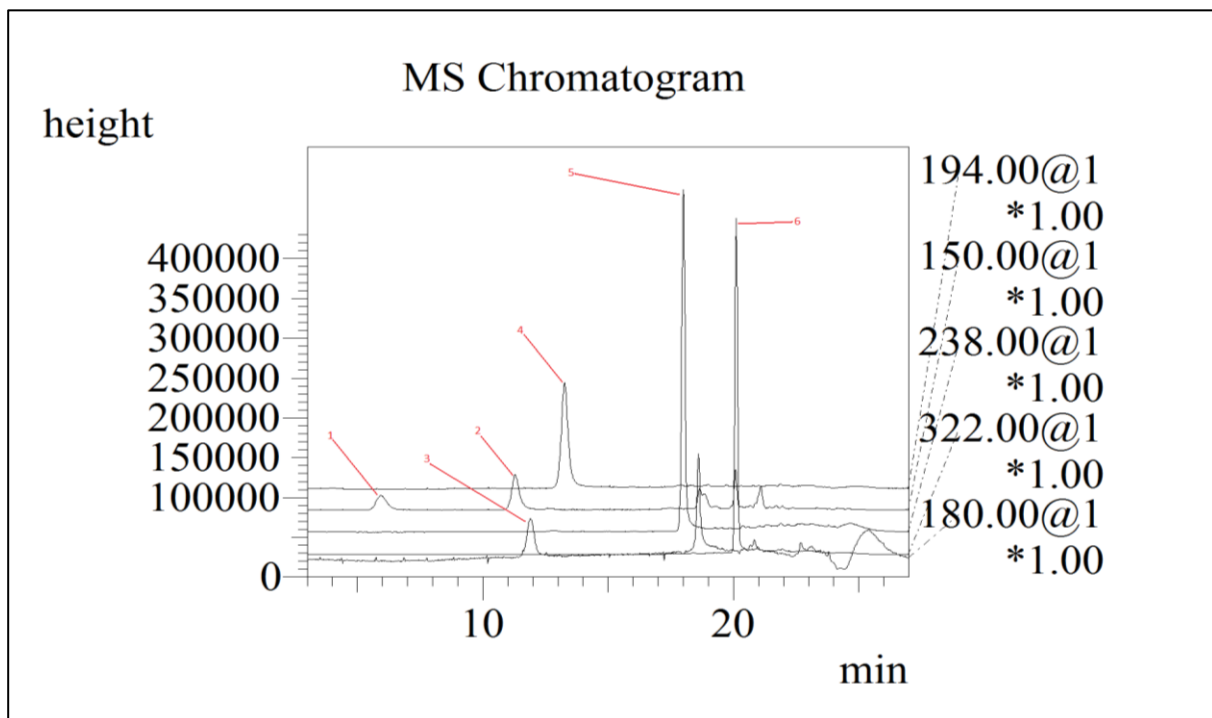
Tabell 4-7 Oversikt over resultater fra validering.

	Katinon	Metamfetamin	MDA	MDMA	Ketamin	DOI
Repeterbarhet (%) 10 ng/ml (n=6)	21	-	-	27	8	12
Repeterbarhet (%) 50 ng/ml (n=5)	16	26	16	26	12	14
Repeterbarhet (%) 500 ng/ml (n=6)	28	23	32	15	7	16
Linearitet (r^2) 10-250 ng/ml	1,0000	0,9939	0,9975	0,9983	0,9978	0,9975
Deteksjonsgrense (pg/ml)	160,5	125,4	2608,8	132,9	39,3	865,8

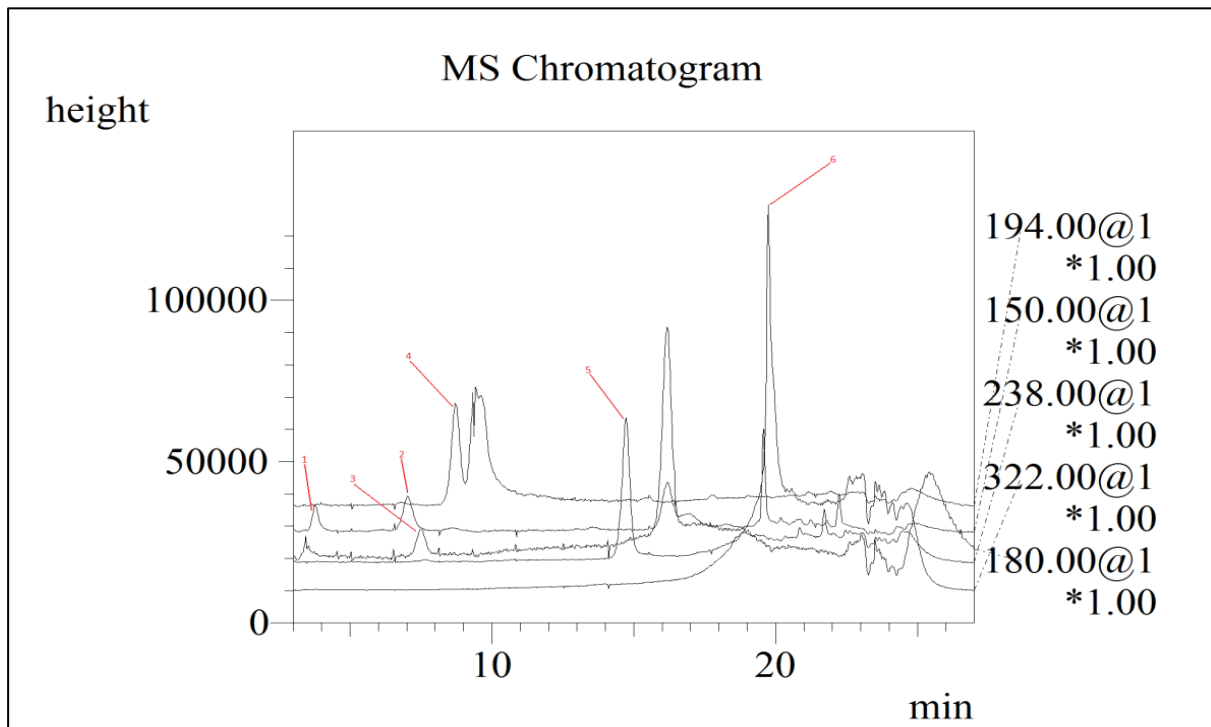
Donor: 80 μ l fullblod, akseptor: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 15 V, ekstraksjonstid: 5 minutter



Figur 4-7 Kromatogram fra ekstraksjon med 500 ng/ml analytter. 1=katinon, 2=metamfetamin, 3=MDA, 4=MDMA, 5=ketamin og 6=DOI. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 15 V, ekstraksjonstid: 5 minutter.



Figur 4-8 Kromatogram fra ekstraksjon med 50 ng/ml analytter. 1=katinon, 2=metamfetamin, 3=MDA, 4=MDMA, 5=ketamin og 6=DOI. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 15 V, ekstraksjonstid: 5 minutter.



Figur 4-9 Kromatogram fra ekstraksjon med 10 ng/ml analytter. 1=katinon, 2=metamfetamin, 3=MDA, 4=MDMA, 5=ketamin og 6=DOI. Donorfase: 80 μ l fullblod tilsatt analytter til en konsentrasjon på 5 μ g/ml, akseptorfase: 10 μ l 10 mM CH_3COOH , organisk fase: ENB, spenning: 15 V, ekstraksjonstid: 5 minutter.

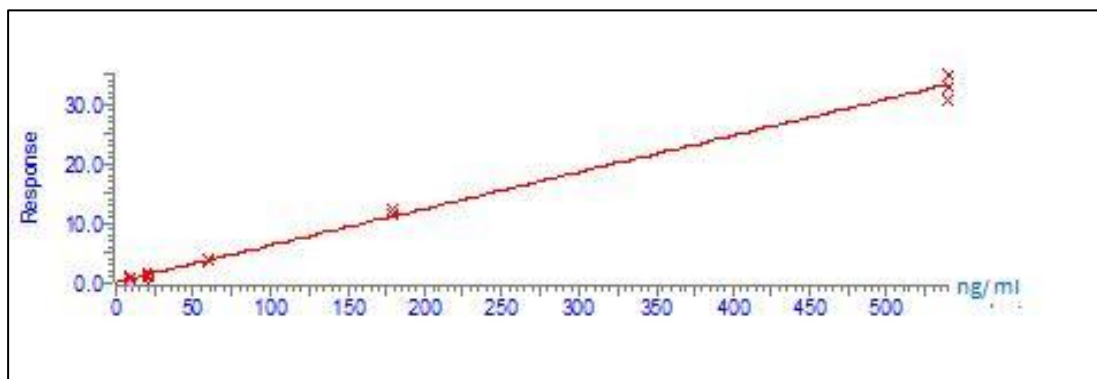
4.7 Reelle prøver

Det ble utført et forsøk med reelle prøver ved FHI, divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning. Opprinnelig var det åtte prøver og disse inneholdt stoffene katinon, metamfetamin, MDMA, MDA og ketamin. Ingen av dem inneholdt DOI. To av prøvene som begge inneholdt katinon er utelatt fra resultatene oppnådd med EME vist i tabell 4-9. Dette skyldes at innholdet av katinon i prøvene lå under det laveste punkt på kalibreringskurven, og fordi det ikke forelå noen tidligere målte verdier for dette stoffet i prøvene til å beregne et prosentvis avvik.

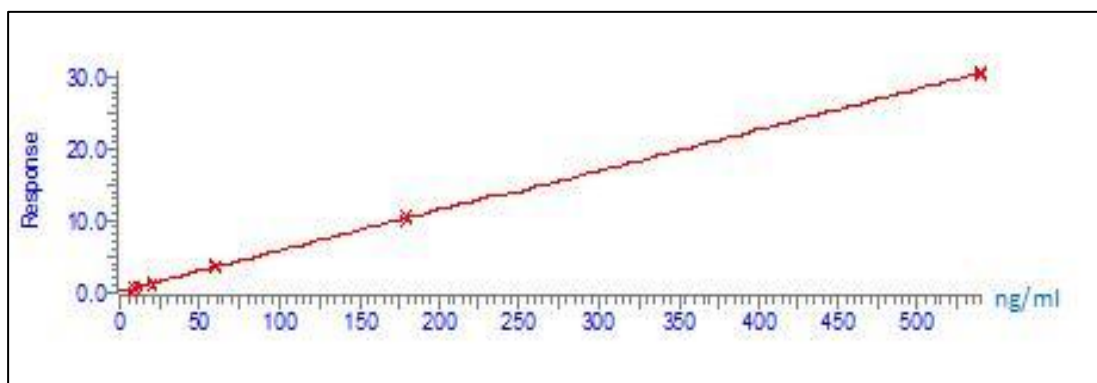
Kalibreringskurver ble laget ved å tilsette rent fullblod alle stoffene til konsentrasjoner på 10, 20, 60, 180 og 540 ng/ml. I tillegg ble det tilsatt internstandarder (MDMA d5 og metamfetamin d11) til en konsentrasjon på 1 ng/ml. For hvert konsentrasjonsnivå ble det ekstrahert tre paralleller. Alle parallellene av standardene ble ekstrahert med 80 µl donorfase, 10 µl 10 mM CH₃COOH som akseptorfase og ENB som organisk fase. Spenningspotensialet over væskemembranen var 15 V og hver ekstraksjon pågikk i 5 minutter. Kalibreringskurvene er vist i figurene 4-10 til 4-13. Responsen som er angitt på y-aksene i disse figurene er beregnet etter følgende ligning:

$$Respons = \frac{C_{IS}}{H_{IS}} * H_a \quad (4-1)$$

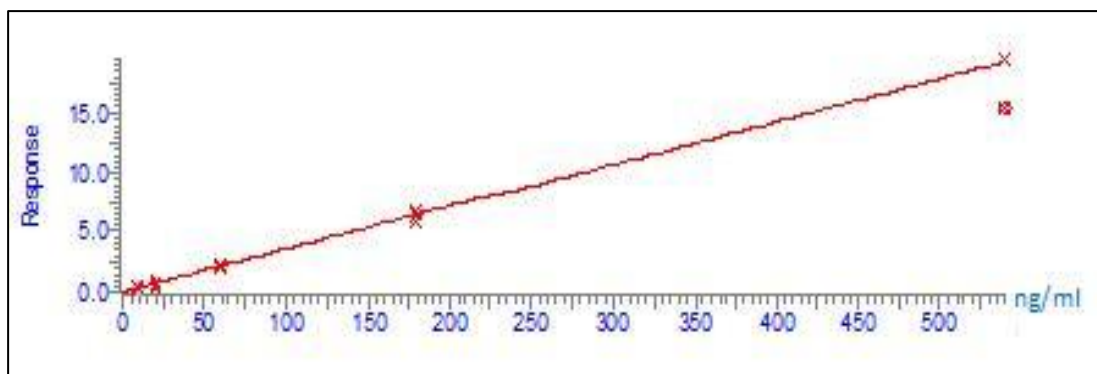
C_{IS} i ligning 4-1 er konsentrasjonen av internstandard. H_{IS} er topphøyden av internstandard og H_a er topphøyden av den aktuelle analytten. En oversikt over verdiene for regresjonslinjene og regresjonskoeffisientene er gitt i tabell 4-8. Lineariteten i det valgte konsentrasjonsområdet var tilfredsstillende for alle stoffene. Det ble også analysert en blank blodprøve og en blank blodprøve som var tilsatt internstandard. Dette ble gjort for å undersøke om det var interfererende komponenter i blodet som ble brukt til å lage kalibreringskurver med som kunne påvirke analysene. Ingen resultater ble funnet som tydet på dette.



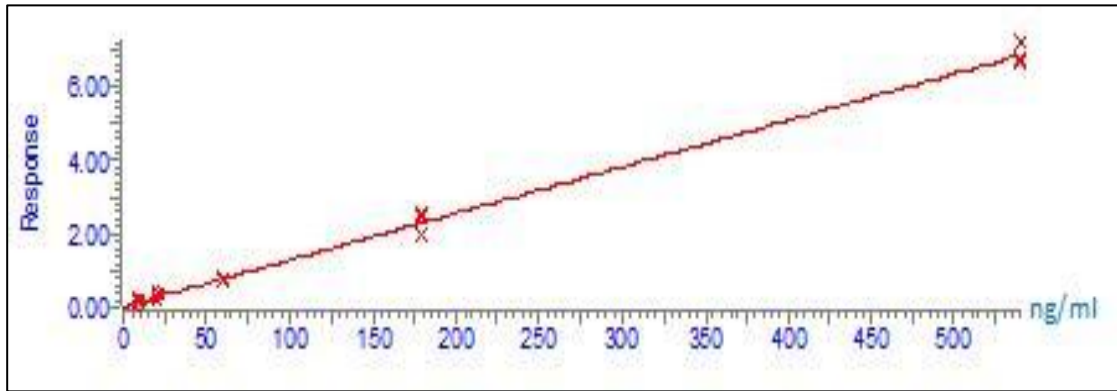
Figur 4-10 Kalibreringskurve for metamfetamin i fullblod.



Figur 4-11 Kalibreringskurve for MDMA i fullblod.



Figur 4-12 Kalibreringskurve for MDA i fullblod.



Figur 4-13 Kalibreringskurve for ketamin i fullblod.

Tabell 4-8 Regresjonslinjer og regresjonskoeffisienter for kalibreringskurver

Stoff	Regresjonslinje ($y = a * x + b$)	Regresjonskoeffisient (r^2)
Metamfetamin	$0.0617792 * x + 0,111381$	0,996413
MDMA	$0.056462 * x + 0,1709660$	0,999338
MDA	$0.0356945 * x + 0,0119403$	0,996737
Ketamin	$0.0127259 * x + 0,00465227$	0,994325

De reelle blodprøvene var før forsøket klargjort av FHI ved at 100 µl av hver prøve var tilsatt 20 µl internstandard til en konsentrasjon på 1 ng/ml.

80 µl av blandingen ble ekstrahert med EME under de betingelsene som tidligere var blitt optimalisert for dette systemet. For hver prøve ble det ekstrahert to paralleller.

Ved hjelp av kalibreringskurvene ble mengden stoffer i de ulike reelle prøvene bestemt. Av åtte blodprøver var fem fra levende individer, mens de tre resterende prøvene var fra avdøde personer. Tabell 4-9 viser resultatene fra ekstraksjonene gjort med EME, mens tabell 4-10 viser prosent avvik fra det som tidligere hadde blitt målt av FHI. Avvikene varierte mellom 4 % og 34 %. FHI opplyste om at det ble godtatt forskjeller mellom paralleller på opptil 30 % med deres rutinemeter og i så henseende viste resultatene fra forsøket gjort med EME seg å være tilfredsstillende med unntak av ett tilfelle som lå over grensen. Til tross for at likblod var antatt å være en svært komplisert matriks å ekstrahere fra, indikerer prosent avvikene i tabell 4-10 og renheten av kromatogrammene i figur 4-17 at EME kan være en aktuell prøveopparbeidelsesmetode også for denne typen matriks.

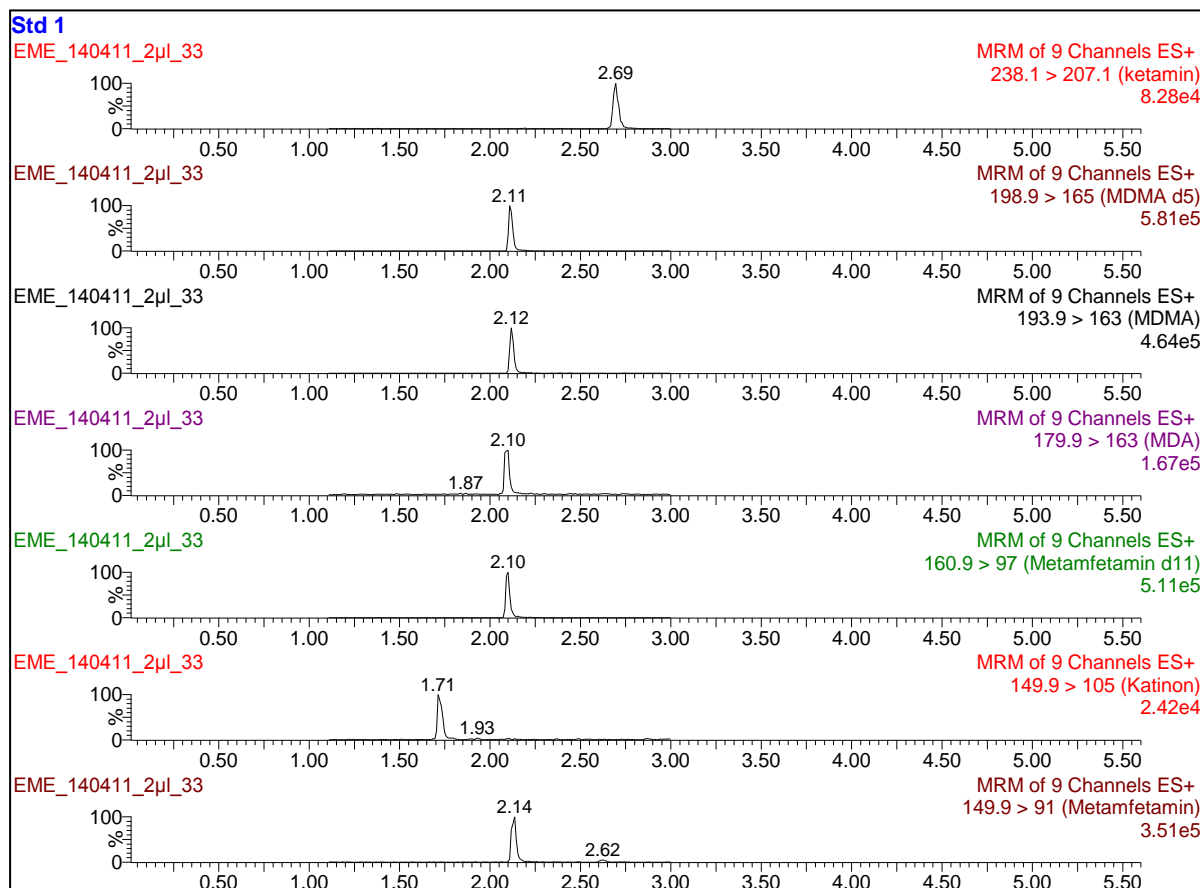
Tabell 4-9 Resultater fra ekstraksjoner med EME

Sak	Metamfetamin (snitt ng/ml)	MDMA (snitt ng/ml)	MDA (snitt ng/ml)	Ketamin (snitt ng/ml)
Kjøresak 1	558			
Kjøresak 2	226			379
Kjøresak 3	996	405	21	
Obduksjonssak 1				1952
Obduksjonssak 2		3005	80	
Obduksjonssak 3	316			

Tabell 4-10 Prosentvis avvik fra verdier målt ved Folkehelseinstituttet divisjon for rettskoksikolog og rusmiddelforskning. FHI= Folkehelseinstituttet.

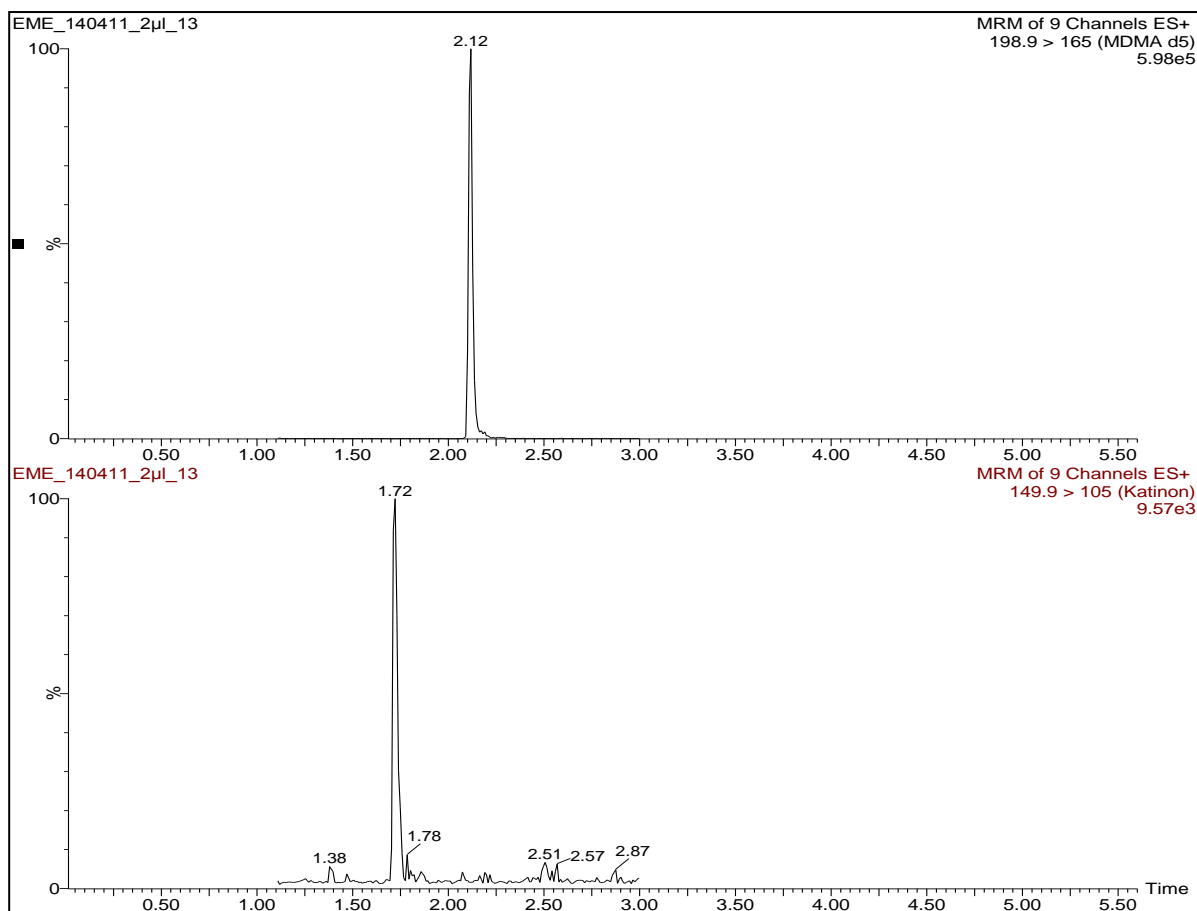
Sak	Metamfetamin FHI (% avvik)	MDMA FHI (% avvik)	MDA FHI (% avvik)	Ketamin FHI (% avvik)
Kjøresak 1	34			
Kjøresak 2	26			-6
Kjøresak 3	-13	-25	Ikke målt	
Obduksjonssak 1				24
Obduksjonssak 2		4	Ikke målt	
Obduksjonssak 3	25			

Figur 4-14 viser kromatogrammer for analytter og internstandarder fra en ekstraksjon av standardløsningen med konsentrasjon på 10 ng/ml. m/z -verdiene som masseanalysatoren ble operert til å måle på var 149.9 (metamfetamin og katinon), 160.9 (metamfetamin d11), 179.9 (MDA), 193.9 (MDMA), 198.9 (MDMA d5) og 238.1 (ketamin). Av denne figuren går også retensjonstidene for de ulike analyttene fram.



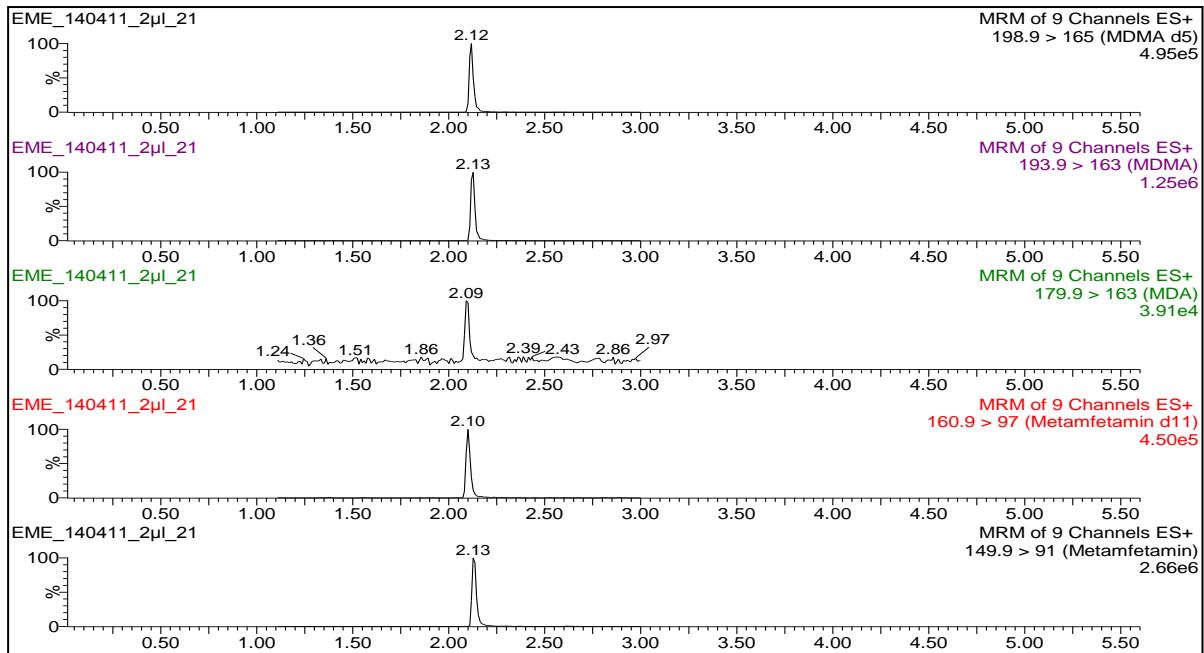
Figur 4-14 Standardprøve 10 ng/ml av katinon, ketamin, metamfetamin, MDA og MDMA.

I figur 4-15 kan man se av det nederste kromatogrammet at katinon er tilstede i den reelle blodprøven. Retensjonstid og m/z -verdi sammenfaller med tilsvarende verdier for katinon i kromatogrammet fra standarden (jfr. Figur 4-14). Innholdet av katinon i denne prøven ble kvantifisert og som tidligere nevnt lå dette resultatet under det laveste punktet på kalibreringskurven og er derfor ikke tatt med i oppgaven. Av kromatogrammene vist i figur 4-15 går det fram at tilstedeværelsen av forurensninger er svært liten. Dette viser igjen at man får svært rene kromatogrammer når man ekstraherer ubehandlet fullblod med EME, og analyserer dem på LC-MS med MRM.



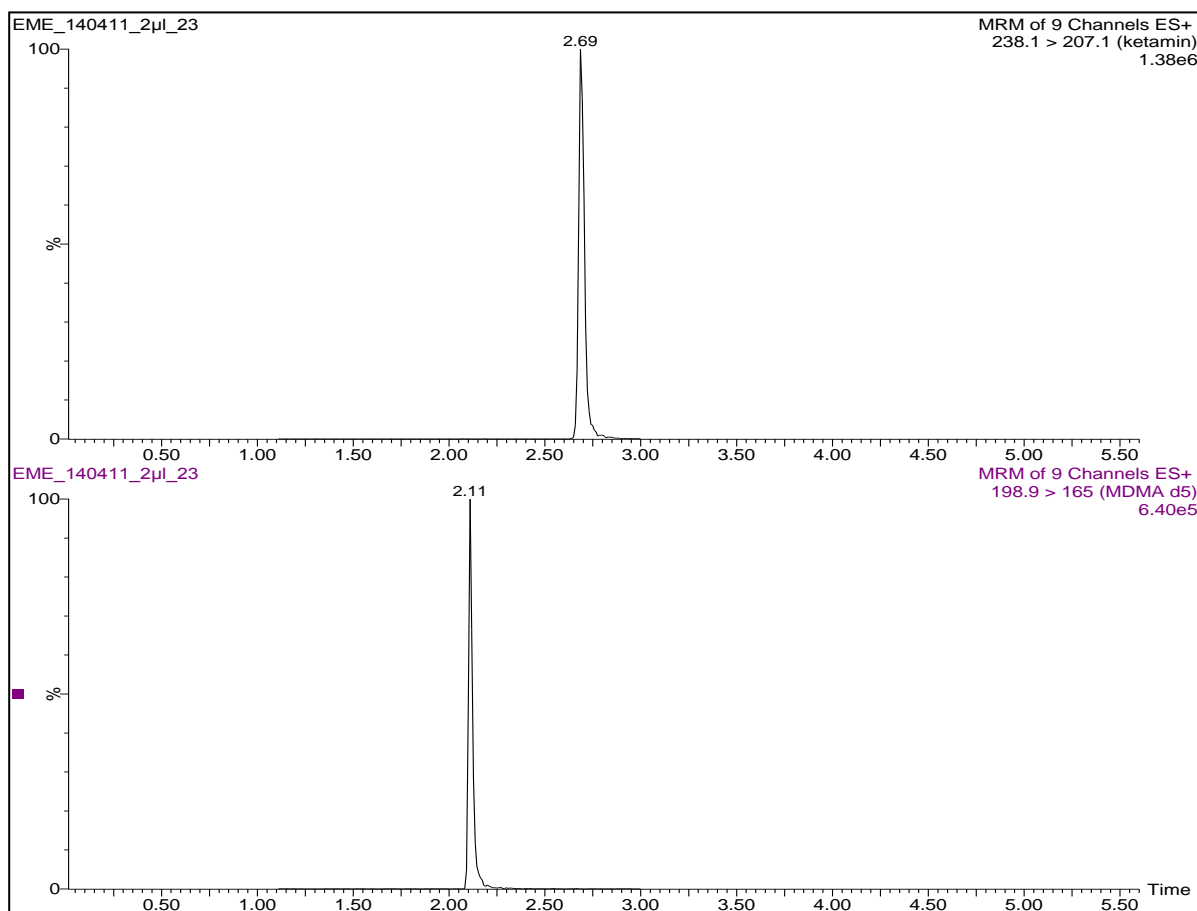
Figur 4-15 Nederste kromatogram viser tilstedeværelsen av katinon i en reell blodprøve. Øverste kromatogram viser internstandard

Kromatogrammene i figur 4-16 viser at blodprøven fra kjøresak 3 (jfr. Tabell 4-9) inneholder MDMA og dens metabolitt MDA, samt metamfetamin. Retensjonstider og m/z -verdier sammenfaller med tilsvarende verdier for stoffene i kromatogrammene i figur 4-14. Innholdet av stoffene ble kvantifisert med bakgrunn i topphøydene og uttrykkene for regresjonslinjer som er vist i tabell 4-8 for hvert stoff.



Figur 4-16 Kromatogram 2, 3 og 5 viser tilstedeværelsen av henholdsvis MDMA, MDA og metamfetamin. Kromatogram 1 og 4 viser internstandarder.

Figur 4-17 viser tilstedeværelsen av ketamin i blodprøven fra obduksjonssak 1 (jfr. Tabell 4-9). Retensjonstid og m/z -verdi sammenfaller med tilsvarende verdier for ketamin i figur 4-14. Innholdet av stoffet ble kvantifisert med bakgrunn i topphøyden og uttrykket for regresjonslinje som er vist i tabell 4-8.



Figur 4-17 Øverste kromatogram viser tilstedeværelsen av ketamin. Nederste kromatogram viser internstandard.

5. Konklusjon

Målet med denne oppgaven var å utvikle en metode for å ekstrahere et utvalg av narkotiske stoffer fra ubehandlet fullblod med et stillestående EME-systemt. Det var ønskelig å ekstrahere fra små prøvevolumer, på et lavt spenningsnivå og med kort ekstraksjonstid. Med dette som målsetning ble de ulike komponentene og parametrene i EME-systemet optimalisert med hensyn på utbytte og renhet av ekstraktet.

Resultatene fra optimaliseringen viste at ENB var det organiske løsemiddelet som ga best utbytte. Av de ulike syrene som ble testet ut som akseptorfase var det eddiksyre som ble valgt på bakgrunn av utbytte og kompatibilitet med analyser på LC-MS. Donorfase ble forsøkt tilsatt acetatbuffer med pH 4 for å redusere proteinbinding av analyttene i blodet, for å kontrollere ionisering og for å fortynne prøven. Dette viste seg imidlertid ikke å øke utbyttet og det ble videre arbeidet med rent fullblod. Det ble valgt å ekstrahere ved 15 V fordi resultatene fra optimaliseringen av spenning for ekstraksjonssystemet ikke viste noen klare forskjeller i utbytte på de ulike spenningsnivåene. Ekstraksjonstiden ble satt til 5 minutter.

Det ble gjort en delvis validering av ekstraksjonsprosessen. Valideringsparametrene som ble testet viste at ekstraksjonsprosessen var godt egnet til formålet. Deteksjonsgrensene for alle analyttene lå under nedre del av anslått relevant konsentrasjonsområde for dem. Regresjonskoeffisientene viste at det var en lineær sammenheng mellom respons og konsentrasjon i konsentrasjonsområdet 10-250 ng/ml. Repeterbarheten var tilfredsstillende med tanke på at det ble ekstrahert fra volumer på mikroliternivå og at utstyr for EME ikke er kommersielt tilgjengelig.

Det optimaliserte EME-systemet ble også prøvd med åtte reelle blodprøver som inneholdt de aktuelle narkotiske stoffene med unntak av DOI. Sammenlignet med resultatene som FHI, divisjon for rettstoksikologi og rusmiddelforskning hadde oppnådd med rutinemetoder, viste de fleste ekstraksjonene gjort med EME seg å ligge innenfor grenseverdien for avvik mellom paralleller som det ble operert med der. Kun én ekstraksjon lå noe over denne grenseverdien. Disse resultatene viser at EME kan ha en fremtid som en mulig prøveopparbeidelsesmetode også innen rettstoksikologi. De små prøvevolumene og den korte ekstraksjonstiden er egenskaper ved EME som er relevante innen dette området. For fremtiden er det ønskelig å

gjøre EME til et enda mer attraktivt alternativ for prøveopparbeidelse ved å automatisere systemet.

Kildeliste

- [1] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393** (2009) 921.
- [2] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Electrical potential can drive liquid-liquid extraction for sample preparation in chromatography*, *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **27** (2008) 934.
- [3] G. Theodoridis, E.H.M. Koster, G.J. de Jong, *Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples*, *Journal of Chromatography B* **745** (2000) 49.
- [4] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*, *Journal of Chromatography A* **1184** (2008) 132.
- [5] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Solvent microextraction into a single drop*, *Analytical Chemistry* **68** (1996) 2236.
- [6] H.H. Liu, P.K. Dasgupta, *Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop*, *Analytical Chemistry* **68** (1996) 1817.
- [7] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*, *Analytical Chemistry* **71** (1999) 2650.
- [8] T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction - Comparison with conventional liquid-liquid extraction*, *Journal of Chromatography A* **963** (2002) 3.
- [9] T.S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Experiences with carrier-mediated transport in liquid-phase microextraction*, *Journal of Chromatographic Science* **44** (2006) 308.
- [10] A. Gjelstad, T.M. Andersen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*, *Journal of Chromatography A* **1157** (2007) 38.
- [11] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **23** (2004) 1.
- [12] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H.G. Uglund, T. Gronhaug, *Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug*

- analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A **873** (2000) 3.
- [13] T.S. Ho, T. Vasskog, T. Anderssen, E. Jensen, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*, Analytica Chimica Acta **592** (2007) 1.
- [14] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*, Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **817** (2005) 3.
- [15] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - New concept for rapid sample preparation of biological fluids*, Journal of Chromatography A **1109** (2006) 183.
- [16] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*, Journal of Chromatography A **1124** (2006) 29.
- [17] M. Balchen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*, Journal of Chromatography A **1152** (2007) 220.
- [18] M. Balchen, L. Reubsæet, S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of peptides*, Journal of Chromatography A **1194** (2008) 143.
- [19] I.J.O. Kjelsen, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples*, Journal of Chromatography A **1180** (2008) 1.
- [20] E.L. Øiestad, U. Johansen, Å.M.L. Øiestad, A.S. Christophersen, *Drug Screening of Whole Blood by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, Journal of Analytical Toxicology **In press** (2011).
- [21] *Rusmiddelstatistikk Folkehelseinstituttet - Funn i blodprøver hos bilførere mistenkt for påvirket kjøring 2009*, Nasjonalt folkehelseinstitutt, 07.05.2011, <http://www.fhi.no/dokumenter/ffabd67275.pdf>
- [22] L.E.E. Eibak, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions-Fast isolation of drugs from untreated human plasma*, Journal of Chromatography A **1217** (2010) 5050.

-
- [23] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation*, Journal of Chromatography A **1174** (2007) 104.
- [24] T.M. Middelthon-Bruer, A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs*, Journal of Separation Science **31** (2008) 753.
- [25] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS, Bergen, 2004.