

**Utvikling og karakterisering av en
elektromembranekstraksjonsprobe
direkte koblet til
massespektrometri**

*Et nytt system for monitorering av in vitro
legemiddelmetabolisme i sanntid*

Helene Bonkerud Dugstad



Masteroppgave i legemiddelanalyse

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2013

Utvikling og karakterisering av en elektromembranekstraksjonsprobe direkte koblet til massespektrometri

Masteroppgave ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Det praktiske laboratoriearbeidet ble gjennomført ved

Institut for Farmaci og Analytisk Kemi,

Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Lektor Nickolaj Jacob Petersen

Lektor Henrik Jensen

Professor Steen Honorè Hansen

© Forfatter Helene Bonkerud Dugstad

År 2013

Tittel "Utvikling og karakterisering av en elektromembranekstraksjonsprobe direkte koblet til massespektrometri"

Forfatter Helene Bonkerud Dugstad

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

En elektromembranekstraksjonsprobe (EME-probe) i mikroskala ble utviklet og koblet direkte til elektrosprayionisering-massespektrometri (ESI-MS). EME-probe/MS-systemet ble anvendt i in vitro studier av legemiddelmetabolisme mediert av rottelevermikrosomer. EME-proben ekstraherte legemiddelsubstansene og de mest upolare metabolittene fra en 1 mL reaksjonsløsning (37 °C) til en akseptorløsning med 60 mM maursyre. Akseptorløsningen strømmet kontinuerlig gjennom proben med en hastighet på 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ og førte ekstraktet direkte til MS for deteksjon. Den sentrale delen av EME-proben var en organisk væskemembran (SLM) som ble dannet ved å immobilisere 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) i porene på en hullfiber. SLM ble plassert i reaksjonsløsningen, og de ioniserte analyttene migrerte elektrokinetisk over væskemembranen med elektrisk spenning som drivkraft. Ekstraksjonseffektiviteten i EME-probe/MS-systemet kunne lett kontrolleres ved å justere spenningen, lengden av SLM og volumet av reaksjonsløsningen. For å unngå at reaksjonskinetikken skulle bli forstyrret var det viktig at ekstraksjonsprosessen ikke påvirket totalkonsentrasjonen i reaksjonsløsningen i betydelig grad. EME-proben ble derfor operert med en ekstraksjonsspenning på 2,5 V og en 1 mm lang SLM. Disse "myke" ekstraksjonsbetingelsene var avgjørende for troverdig måling av kinetikdata. EME-probe/MS-systemet monitorerte in vitro metabolisme av amitriptylin, prometazin, metadon, loperamid og imipramin, og innhentet kinetiske tidsprofiler for modellanalyttene.

Forord

Først vil jeg takke min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for veldig god veiledning under hele masteroppgaven. Du var alltid involvert og tilstede i prosjektet mitt, og jeg har satt stor pris på dine raske og konstruktive tilbakemeldinger både under labarbeidet og i skriveprosessen.

En stor takk rettes også til Nickolaj Jacob Petersen for uvurderlig veiledning under det praktiske laboratoriearbeidet i København. Takk for all tid og tålmodighet du investerte i arbeidet mitt. Takk til Henrik Jensen, Charlotte Gabel-Jensen og Steen Honoré Hansen ved Institut for Farmaci og Analytisk Kemi i Danmark for råd og tips underveis i prosjektet, og Maria Ramos Payàn for praktisk hjelp (og sosiale labpauser) ved oppstart på laben.

Til slutt en stor takk til Cecilie Rosting. Du har vært med på oppturer og nedturer på laben, og vært en god støttespiller under hele masterarbeidet i Danmark. Takk for at du bidro til at oppholdet i København ble en opplevelse jeg sent vil glemme!

Oslo, 15.05.2013

Helene B. Dugstad

Forkortelser

μA	Mikroamper
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
μm	Mikrometer
μL	Mikroliter
amu	Atommasseenhet
CE	Kapillærelektroforese
cm	Centimeter
CYP	Cytokrom P450-enzym
DEHP	Di(etylhexyl)fosfat
DESI	Desorpsjon elektrosprayionisering
EDDP	Etyl-dimetyl-difenyl-pyrrolinium
EF	Oppkonsentreringsfaktor
EME	Elektromembranekstraksjon
ESI	Elektrosprayionisasjon
HCl	Saltsyre
HCOOH	Maursyre
HF	Hullfiber
HPLC	Væskekromatografi
i.d.	Indre diameter
kV	Kilovolt
LC- MS	Væskekromatografi med massespektrometer som deteksjon
LLE	Væske-væske-ekstraksjon
LPME	Væske-fase-mikroekstraksjon

M	Molar
mM	Millimolar
MgCl ₂	Magnesiumklorid
min	Minutter
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MRM	Multiple Reaction Monitorering
MS	Massespektrometri
m/z	masse/ladning
NADPH	β-nikotinamid adenin dinukleotid 2-fosfat
NAT	N-acetyl transferase
NaOH	Natriumhydroksid
NMR	Kjernemagnetisk resonans
NPOE	2-Nitrofenyloktyleter
o.d.	Ytre diameter
pg	Pikogram
rpm	Omrøringer per minutt
sek	Sekunder
SLM	Kunstig væskemembran (Supported Liquid Membrane)
TEHP	Tris(etylhexyl)fosfat
TOF	Time-of-flight masseanalysator
UGT	UDP-glukuronyltransferase
UV	Ultrafiolett
V	Volt
v/v	Volumprosent

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	1
2	Teori.....	4
2.1	Prinsipp for elektromembranekstraksjon	4
2.2	Teoretiske modeller for ekstraksjonsprosessen og distribusjonsprosessen i EME	6
2.3	In vitro metabolismestudier	9
2.3.1	Metabolittgenerering.....	9
2.3.2	Metabolittisolering	10
2.3.3	Metabolittdetektering	10
2.3.4	Metabolittidentifisering.....	11
2.4	EME-probe direkte koblet til ESI-MS	12
3	Eksperimentelt.....	16
3.1	Modellanalytter	16
3.2	Ekstraksjonsbetingelser	18
3.3	Analysebetingelser	20
3.4	Løsninger	21
3.5	Kjemikalier	22
3.6	EME-probe med on-line MS deteksjon for metabolismeforsøk.....	22
3.7	EME-probe med off-line CE deteksjon for optimaliseringsforsøk.....	23
3.8	Beregning av utbytte, oppkonsentrering og halveringstid.....	23
3.8.1	Utbytte.....	23
3.8.2	Oppkonsentrering.....	24
3.8.3	Halveringstid.....	24
4	Resultat og diskusjon	25
4.1	Prinsipp for EME-probe/MS-systemet.....	25

4.2	Optimalisering av EME-probens ekstraksjonseffektivitet.....	28
4.2.1	Membranstabilitet	31
4.2.2	Carry-over effekt	33
4.2.3	Omrøring i prøveløsningen	33
4.2.4	Ekstraksjonskinetikk	34
4.3	Teoretiske betraktninger for optimal monitorering av in vitro metabolisme...	34
4.4	Optimalisering av EME-probe/MS-systemet for in vitro metabolismestudier .	36
4.5	Validering av EME-probe/MS-systemet	44
4.6	Anvendelse av EME-probe/MS-systemet i in vitro metabolismestudier	45
4.7	Veien videre for EME-probe/MS-systemet.....	50
5	Konklusjon.....	52
	Litteraturliste.....	54

1 Introduksjon

Nedskalering av prøveopparbeidelsesmetoder til mikronivå har vært en viktig trend i biokjemisk analyse de siste tiårene. Omfattende forskning har vært rettet mot miniatyrisering av væske-væske-ekstraksjon og fast-fase-ekstraksjon for å redusere prøveopparbeidelsestid og løsemiddelforbruk, og samtidig oppnå høy selektivitet og oppkonsentrering fra små prøvevolum. Et viktig fremskritt i forskningen var utviklingen av hullfiber væske-fase-mikroekstraksjon (HF-LPME) på begynnelsen av 2000-tallet [1]. I HF-LPME ekstraheres analytten med passiv diffusjon gjennom en organisk væskefilm som er impregnert i porene på en hullfiber. Ved å justere pH i prøveløsningen og akseptorløsningen ekstraheres analytten inn i væskemembranen på uionisert form, og re-ekstraheres til akseptorløsningen på ionisert form. HF-LPME fikk mye oppmerksomhet fordi teknikken ga høy oppkonsentrering fra relativt små prøvevolum (~250-2000 μL), forbruket av organisk løsemiddel var svært lavt (~15 μL) og hullfiberen av polypropylen var robust og billig [2]. Svakheten med HF-LPME var at ekstraksjonsprosessen var relativt langsom. Ekstraksjonen brukte lang tid på å komme i likevekt og for å oppnå maksimalt utbytte ble det observert ekstraksjonstider på 15 til 45 min, avhengig av prøvevolum [2, 3]. For å imøtekomme denne utfordringen ble elektromembranekstraksjon (EME) introdusert i 2006 som en videreutvikling av HF-LPME, og EMEs høye hastighet og gode selektivitet ble utpekt som de unike fordelene [4]. I EME ekstraheres ioniserte analytter gjennom en organisk væskemembran med elektrisk spenning som drivkraft, og ved å styre massetransporten over væskemembranen med spenning ble ekstraksjonstidene 6-17 ganger redusert. På svært kort tid, helt ned mot 60 sek, ble det i et stillestående system oppnådd akseptable utbytter for en rekke legemiddelsubstanser [5, 6]. EME gir svært god opprensning fra biologiske prøver fordi ekstraksjonen diskriminerer makromolekyler, nøytrale substanser og polare komponenter fra prøvematrix. I tillegg oppnås svært god oppkonsentrering og en oppkonsentreringsfaktor på opptil 190 har blitt rapportert i litteraturen [7]. En annen interessant fordel med EME er teknikkens fleksibilitet. Ved å justere ekstraksjonsbetingelsene kan ekstraksjonen skreddersys for ulike anvendelser, og det har blitt rapportert om bruk av EME for isolering av sure og basiske legemiddelsubstanser [8, 9], polare og upolare analytter [9], peptidanalyser [10],

prøveopparbeidelse fra ulike biologiske matrixer (spytt, plasma, urin, brystmelk) [11, 12], ekstraksjon fra miljøprøver [13, 14], og metabolismestudier [15, 16].

EME har fortrinnsvis blitt utført med en sylinderformet hullfiber som bærer for den organiske væskemembranen, og hullfiberen tillater ekstraksjoner fra prøveløsningsvolum helt ned mot 50 μL . Ytterligere nedskalering til miniaturiserte konfigurasjoner som kan ekstrahere fra prøveløsningsvolum på mindre enn 50 μL og som utnytter en flat polypropylenmembran har også blitt studert. En tilnærming var et dråpe-til-dråpe format hvor analytten ble ekstrahert fra en prøveløsningsdråpe på 10 μL , gjennom en flat væskemembran immobilisert med et organisk løsemiddel og inn i en 10 μL akseptordråpe på den andre siden av væskemembranen [17]. Prøvedråpen var plassert på aluminiumsfolie koblet til en spenningskilde og en elektrode ble plassert i akseptordråpen for å oppnå elektrisk krets over væskemembranen. En annen tilnærming var et mikrochipformat der den flate væskemembranen var inkorporert mellom to plater av polymetylmetakrylat [18]. Prøveløsningen ble pumpet med en sprøytepumpe inn i en liten kanal i chipen, der prøveløsningen fikk kontakt med væskemembranen, og analytten ble ekstrahert over i en annen kanal med akseptorløsning. EME på chip ble også studert i et dobbelt-flow system der både prøveløsning og akseptorløsning var i bevegelse. I dette systemet ble akseptorløsningen pumpet til en kanal i chipen og direkte videre til et analyseinstrument der ekstraktet ble analysert og detektert on-line [16].

Anvendelsesområdet til EME har hovedsakelig vært prøveopparbeidelse med off-line deteksjon, der ekstraktet har blitt oppsamlet med en pipette og analysert med kromatografisk eller elektroforetisk analyse. EME på chip direkte koblet til MS var første gang EME ble brukt i on-line analyse. Det unike med on-line analyse er at ekstraksjonen kan følges i sanntid, og EME på chip med on-line analyse viste god evne til å monitorere og karakterisere in vitro legemiddelmetabolisme av modellanalytten amitriptylin [15]. Dagens metode for metabolismescreening baserer seg på off-line analyse av prøver fra ulike tidspunkter i metabolismereaksjonen. En begrensning med metoden er at informasjon om metabolitter med kort levetid og intermediære metabolske produkter i mange tilfeller ikke detekteres [19]. Sanntidsmonitorering som oppnås med on-line

analyse innhenter kontinuerlig informasjon fra reaksjonsløsningen, og kan derfor gi en mer detaljert og fullstendig forståelse av metabolismen.

Dette arbeidet er en videreføring av in vitro metabolismestudiene som ble utført med EME på chip direkte koblet til MS. EME på chip ga gode ekstraksjonsutbytter og høy oppkonsentrering fordi polypropylenmembranen var svært tynn (25 μm) og analyttens diffusjonsvei i chipen var svært kort (< 50 μm) [18]. Utfordringen med chip-formatet var at den organiske væskemembranen var inkorporert i chipen slik at utskiftning og regenerering var tidkrevende og til dels komplisert. I tillegg var chipens hjemmebygde konstruksjon vanskelig å reproducere i andre laboratorier som ønsket å gjøre relaterte forsøk. Med bakgrunn i chipens tekniske begrensninger ble en EME-probe i mikroskala utviklet. EME-proben hadde en organisk væskemembran som var åpen og tilgjengelig for vedlikehold, og probens enkle utforming kunne lett gjenkonstrueres i andre laboratorier uten spesielt utstyr eller verktøy. EME-proben ble koblet direkte til MS og studert for anvendelse i in vitro metabolismestudier.

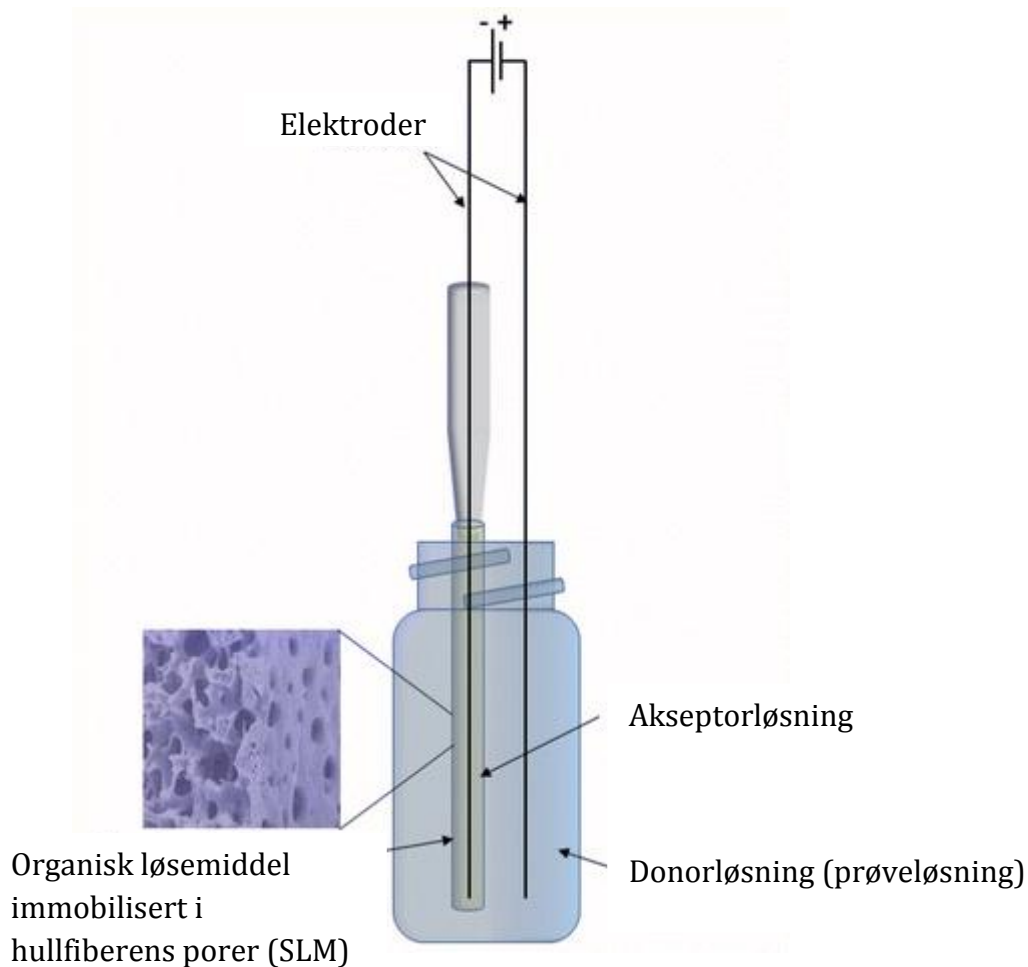
Følgende målsetninger ble satt for dette arbeidet:

- Konstruere en EME-probe og optimalisere de tekniske betingelsene.
- Optimalisere EME-proben med hensyn på parametere som påvirker ekstraksjonseffektiviteten, og karakterisere betingelser som gir optimal monitorering av in vitro metabolisme.
- Koble EME-proben direkte til elektroprayonisering-massespektrometri og undersøke dataenes repeterbarhet og linearitet.
- Anvende EME-probe/MS-systemet i in vitro metabolismestudier for en rekke basiske, upolare legemiddelsubstanser.

2 Teori

2.1 Prinsipp for elektromembranekstraksjon

Et generelt oppsett for EME er beskrevet i figur 1.



Figur 1 Generelt oppsett for EME [20]

En prøveløsning med analytten som skal isoleres utgjør donorfasen i systemet. En porøs hullfiber plasseres i prøveløsningen, og det innvendige hulrommet i hullfiberen fylles med en vandig løsning som utgjør akseptorfasen. Hullfiberen immobiliseres med et organisk løsemiddel, og ved kapillærkrefter holdes løsemiddelet i fiberens porer og danner en organisk væskemembran (SLM = Supported Liquid Membrane). Det

organiske løsemiddelet er ikke-blandbart med vann og SLM skaper en hydrofob barriere som separerer donorløsningen fra akseptorløsningen. Drivkraften bak ekstraksjonen er elektrisk spenning og ved å plassere en elektrode på hver side av SLM vil ioniserte analytter vandre fra prøveløsningen, gjennom SLM og inn i akseptorløsningen. De ioniserte analyttene vandrer mot elektroden med motsatt ladning, og for kationer må katoden plasseres i akseptorløsningen og anoden i donorløsningen. For anioner må polariteten på elektrodene snus slik at katoden plasseres i donorløsningen og anoden i akseptorløsningen. Spenningen er en justerbar drivkraft der både retning i spenningsfeltet og spenningsnivået raskt og enkelt kan reguleres på en ekstern spenningskilde. EME har blitt utført med spenning som varierer fra 9 V [21] til 300 V [22], og optimal spenning avhenger av egenskapene til SLM og analytten. For å oppnå effektiv ekstraksjon bør pH-betingelsene i prøveløsningen og akseptorløsningen justeres slik at analytten er fullstendig ionisert under hele ekstraksjonen. Det kan gjøres ved tilsats av NaOH eller HCl, avhengig av om analytten er henholdsvis sur eller basisk. Ved avsluttet ekstraksjon samles akseptorløsningen opp med en pipette og injiseres i en autosampler for off-line analyse, eller føres direkte til et analyseinstrument for on-line analyse.

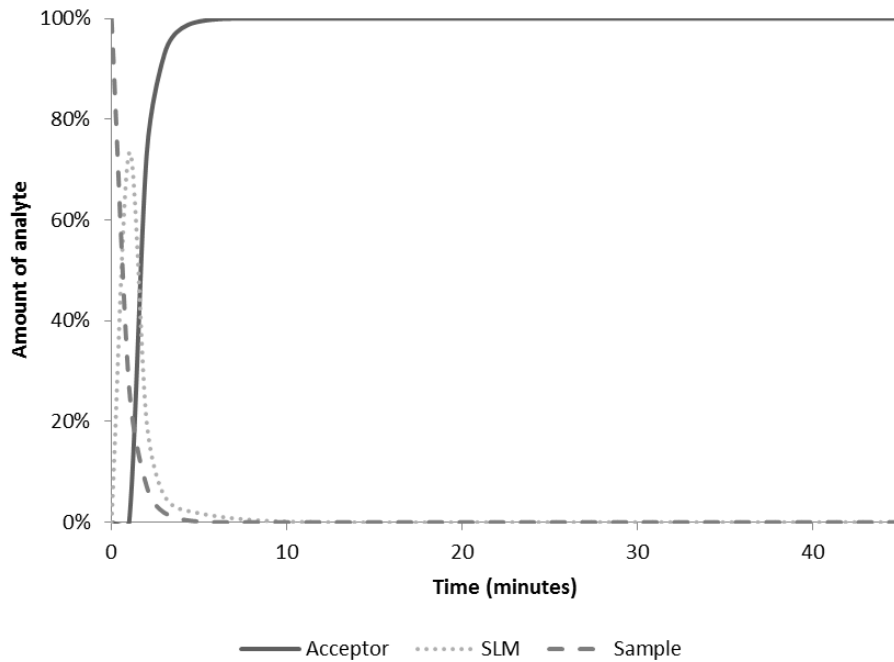
EME er en prøveopparbeidelsesteknikk som utviser høy grad av selektivitet og oppkonsentrering. I biokjemisk analyse er dette svært viktig fordi konsentrasjonsnivået av endogene substanser (som proteiner og peptider) og eksogene substanser (som legemidler) i biologiske prøver ofte er svært lavt, helt ned mot pg/mL - µg/mL. I tillegg inneholder biologiske prøver mange interfererende matrixkomponenter. I EME kan ekstraksjonsselektiviteten kontrolleres ved å justere spenningen og de kjemiske egenskapene til det organiske løsemiddelet i væskemembranen. Nitro-aromatiske løsemidler (for eksempel NPOE) har blitt brukt for ekstraksjon av basiske legemidler [13] og langkjedede alkoholer (for eksempel 1-oktanol) egner seg godt for ekstraksjon av sure legemidler [23]. For ekstraksjon av polare analytter er SLM med organisk løsemiddel alene ikke tilstrekkelig, men studier har vist at tilsats av en ionpardanner (for eksempel di-(etylheksyl) fosfat = DEHP), som kan danne et hydrofobt kompleks med analytten, gir effektive ekstraksjoner [24]. Spenning er også avgjørende for ekstraksjonsselektiviteten. Massetransport av basiske legemiddelsubstanser over en hydrofob SLM ved lav spenning (< 15 V) er i stor grad strukturavhengig [25]. Ved lav

spenning er det hovedsakelig de upolare analyttene med én ladning som penetrerer SLM. Etersom spenningen øker vil mer polare analytter med flere ladninger passere. I EME skjer ekstraksjoner vanligvis fra prøvevolumer på 100 – 2000 μL til akseptorvolumer på 10 – 25 μL . På grunn av denne volumforskjellen og den gode ekstraksjonseffektiviteten oppnås svært god oppkonsentrering.

2.2 Teoretiske modeller for ekstraksjonsprosessen og distribusjonsprosessen i EME

En matematisk modell for flux over SLM i EME kan beskrives med en modifisert Nernst Planck ligning [26]. Ligningen uttrykker hvordan spenning, ionebalanse og absoluttemperatur påvirker analyttens flux over SLM. Spenning har størst påvirkning på analyttens flux, og økende spenning gir økende flux. Lav ionebalanse er også fordelaktig for høy flux, og kan oppnås ved å ekstrahere med høyere ionekonsentrasjon i akseptorløsningen enn i prøveløsningen. Endring i temperatur påvirker også flux over SLM.

En annen teoretisk modell som beskriver distribusjonsprosessen i EME har nylig blitt utviklet [27]. Figur 2 er en distribusjonsprofil som illustrerer modellen og beskriver hvordan konsentrasjonen av analytt endrer seg over tid i donorløsning, akseptorløsning og SLM. Massetransport gjennom SLM er det hastighetsbestemmende trinnet i ekstraksjonsprosessen og profilen beskriver hvordan SLM fanger analytten de første minuttene i ekstraksjonen inntil gjennombrudd i akseptorløsningen etter 5-10 sek.



Figur 2 *Distribusjonsprofil som beskriver den tidsavhengige konsentrasjonen av analytt i akseptorløsning, SLM og donorløsning [27]*

Den tidsavhengige konsentrasjonen i donorløsningen, $C_{Di}(t)$, for analytt i beskrives med ligning 1.

$$C_{Di}(t) = C_{Di}^0 \cdot \exp\left(-\frac{A_f \cdot P_i^{D \rightarrow A}}{V_D} \cdot t\right) \quad (1)$$

Der A_f er det aktive overflatearealet av SLM, $P_i^{D \rightarrow A}$ er permeabilitetskoeffisienten fra donorløsning til akseptorløsning for analytt i , V_D er volum i donorløsningen og C_{Di}^0 er konsentrasjon av analytt i donorløsningen ved $t=0$.

Permeabilitetskoeffisienten er en kinetisk parameter relatert til transport av analytt gjennom SLM. Transport gjennom væskemembranen vil skje delvis ved diffusjon, men hovedsakelig ved elektrokinetisk migrasjon. Elektrokinetisk migrasjon er ladde substansers evne til å migrere i en løsning under påvirkning av elektrisk spenning, og dette prinsippet danner grunnlaget for elektroforese. I EME migrerer analyttene elektrokinetisk gjennom en semipermeabel væskemembran, SLM, med spenning som drivkraft. Det elektroforetiske bidraget til massetransporten gir korte ekstraksjonstider.

Den tidsavhengige konsentrasjonen i SLM, $C_{mi}(t)$, for analytt i beskrives med ligning 2.

$$C_{mi}(t) = \frac{V_D (C_{Di}^0 - C_{Di}(t)) - V_A \cdot C_{Ai}(t)}{V_m} \quad (2)$$

Der V_A er volum av akseptorløsningen, V_D er volum av donorløsningen, V_m er volum av det organiske løsemiddelet i SLM, C_{Ai} er konsentrasjon av analytt i akseptorløsningen og C_{Di} er konsentrasjon av analytt i donorløsningen

Den tidsavhengige konsentrasjonen i akseptorløsningen, $C_{Ai}(t)$, for analytt i beskrives med ligning 3.

$$C_{Ai}(t) = \frac{V_D C_{Di}^0 - C_{Di}(t) (V_D + K_d^* \cdot V_m)}{V_A} \quad \text{når } t \geq t_{lag} \quad (3)$$

Der K_d^* er analyttens distribusjonskoeffisient. Distribusjonskoeffisienten er en parameter som beskriver distribusjon av analytt over grenseflaten mellom donorløsning og SLM. Generelt vil kationiske substanser fordeles dårlig inn i en organisk SLM, men ved å legge et spenningspotensial over væskemembranen vil fordelingskoeffisienten øke betraktelig. I EME vil derfor den protonerte analytten ekstraheres inn i SLM ved hjelp av en spenningsavhengig distribusjonskoeffisient.

Den elektriske ledningsevnen er mye bedre i den vandige akseptor- og donorløsningen sammenlignet med den organiske væskemembranen. Det fører til at det elektriske feltet er veldig sterkt over den tynne SLM, og spenningen spiller en avgjørende rolle i massetransporten inn i væskemembranen og gjennom væskemembranen. Med bakgrunn i ligning (1), (2) og (3) kan det konkluderes med at det tidsavhengige utbyttet i EME kontrolleres av volum i donorløsning, SLM og akseptorløsning samt distribusjonskoeffisienten, overflatearealet av SLM og permeabilitetskoeffisienten. Den teoretiske modellen bekrefter at EME er et distribusjonssystem, i likhet med LPME. I EME er distribusjonskoeffisienten spenningsavhengig, mens i LPME skjer ekstraksjonen etter den enkelte analytts distribusjonskoeffisient mellom organisk og vandig fase. Distribusjon av analytt i EME har også en elektroforetisk komponent. Permeabilitetskoeffisienten er ikke spenningsavhengig, men spenningspotensialet bidrar til økt transport gjennom væskemembranen ved elektrokinetisk migrasjon.

2.3 In vitro metabolismestudier

Legemiddelmetabolisme er den fysiologiske transformasjonen av upolare, farmakologisk aktive legemidler til polare, inaktive, ikke-toksiske molekyler [28]. Biotransformasjonen av legemidler kan følge ulike metabolismeveier. I fase I reaksjoner introduseres en kjemisk reaktiv gruppe til legemiddelet ved for eksempel hydrolyse, oksidasjon eller reduksjon, og prosessen medieres hovedsakelig av cytokrom p450 enzymer (CYP). Fase II er konjugeringsreaksjoner og medieres hovedsakelig av UDP-glukuronyltransferase enzymer (UGT) og N-acetyl transferase (NAT). I fase II reaksjoner konjugeres polare og ioniserbare grupper, som for eksempel glukuronider og sulfater, til fase I metabolittene slik at de blir mer vannløselige og lettere kan skilles ut av kroppen. Biotransformasjon kan også føre til legemiddelinteraksjoner på grunn av enzyminduksjon/-hemming, uønsket rask eliminering av legemiddelet og dannelse av reaktive, aktive eller toksiske metabolitter [28]. Metabolismestudier utgjør derfor en viktig del i utviklingen av nye legemidler, og deteksjon og kvantifisering av legemiddelmetabolitter som er farmakologisk aktive, toksiske og/eller gi opphav til legemiddelinteraksjoner er avgjørende i beslutningen om nye legemiddelkandidater skal forkastes eller optimaliseres videre [29]. Majoriteten av metabolittidentifisering i tidlige faser utføres med in vitro studier fordi det er raskere, enklere, gir muligheten til å undersøke spesifikke enzymatiske systemer og sparer dyreliv.

2.3.1 Metabolittgenerering

Alle in vitro modeller har sine fordeler og begrensninger, og valg av modell avhenger av hva som skal evalueres. In vitro studier blir hovedsakelig utført med hepatocytinkubasjoner, mikrosomer eller rekombinante enzymer [30]. Humant levermateriale gir mest relevante data, men rotte, hund og andre dyr som har en metabolisme som fysiologisk sett tilsvarer humanfysiologi er gode alternative kilder. Hepatocytter er intakte leverceller som inneholder en fullstendig sammensetning av legemiddelmetaboliserende enzymer og kofaktor, inkludert fase I og fase II enzymer [31]. Metabolisme med hepatocytter reflekterer i høy grad in vivo situasjonen, og egner seg godt til å forutsi et legemiddels metabolisme i kroppen. Mikrosomer er en subcellulær fraksjon som representerer en oppkonsentrert kilde av membranbunne

enzymmer [30]. Mikrosomer inneholder kun fase I metaboliserende enzymer, hovedsaklig CYP og UGT, og gir derfor ikke et fullstendig bilde av metabolismen. Rekombinante CYP- og UGT-enzymmer brukes i enkelte tilfeller for å undersøke enzym-substrat spesifisitet [32]. Studier med individuelle enzymer gir spesifikk informasjon om hvilke enzymer som er involvert i metabolismen og hvilke metabolitter som dannes av de ulike enzymene.

2.3.2 Metabolittisolering

Prøvematrixen i in vitro studier er betraktelig mindre kompleks enn biologiske prøver fra in vivo studier. Allikevel er prøveopparbeidelse essensielt før kromatografisk og massespektrometrisk analyse for å øke selektiviteten og hindre kontaminasjon av instrumentet [29]. Proteinfelling er den enkleste formen for prøveopparbeidelse. Teknikken utføres ved å stoppe den metabolske reaksjonen med syre eller organisk løsemiddel, og deretter sentrifugere prøven. Enkelte ganger kreves det mer effektive metoder som fast-fase-ekstraksjon eller væske-væske-ekstraksjon i tillegg til proteinfellingen. MS-baserte metabolittanalyser blir for det meste utført i kombinasjon med et kromatografisk trinn for å separere metabolittene før deteksjon [28]. Væskekromatografi (HPLC) er mye brukt, og det vanligste er å bruke en reversfase HPLC- kolonne med gradienteluering for å retardere og separere metabolitter med ulik hydrofobisitet.

2.3.3 Metabolittdetektering

En kombinasjon av væskekromatografi og massespektrometri (LC/MS) er det viktigste analytiske verktøyet for screening av legemiddelmetabolisme [33]. En masseanalysator operert i full scan gir repetitiv sveiping over et bestemt m/z-intervall, og i massekromatogrammet avdekkes molekylmassene til potensielle metabolitter. Ved å undersøke legemiddelets forventede massetap eller masseaddisjon (for eksempel oksidasjon eller hydrolyse) kan m/z-verdiene gi en foreløpig identifisering av metabolittene [34]. Screening kan også gjøres ved å lage en negativ prøve som referanse [34]. En negativ prøve er en blank prøve uten legemiddel som inkuberes under like betingelser som prøven med legemiddel. Ved sammenligning av prøven og negativkontrollen kan signaler som er tilstede i prøven, og ikke negativkontrollen,

knyttet opp mot m/z -verdien til potensielle metabolitter. I tillegg kan en nullprøve (prøve ved 0 min) brukes til å finne ut om en topp i prøven, som ikke er i negativ kontrollen, er en metabolitt eller en forurensning. Valg av masseanalysator avhenger av hvilken informasjon man søker. Høy deteksjonssensitivitet i full scan er viktig for å identifisere forventede og ikke forventede metabolitter i et stort masseintervall. Høy oppløsning gir god evne til å separere metabolitter med nærliggende m/z -verdi. Hurtig dataoppsamling tillater rask kromatografi og gir effektiv screening av mange legemiddelkandidater. Time-of-flight (TOF) masseanalysator imøtekommer alle disse kravene og er en svært god analysator for metabolismestudier [29]. Orbitrap er et godt alternativ til TOF, men analysatoren er ikke like rask. I visse tilfeller er det vanskelig å detektere metabolitter basert på m/z -verdi alene. Alternative tilnærminger er å radiomerke legemiddelet og detektere metabolittene med en radioaktivitetsdetektor, eller bruke stabil isotopmerking til å detektere metabolitter i ionekromatogrammet [28].

2.3.4 Metabolittidentifisering

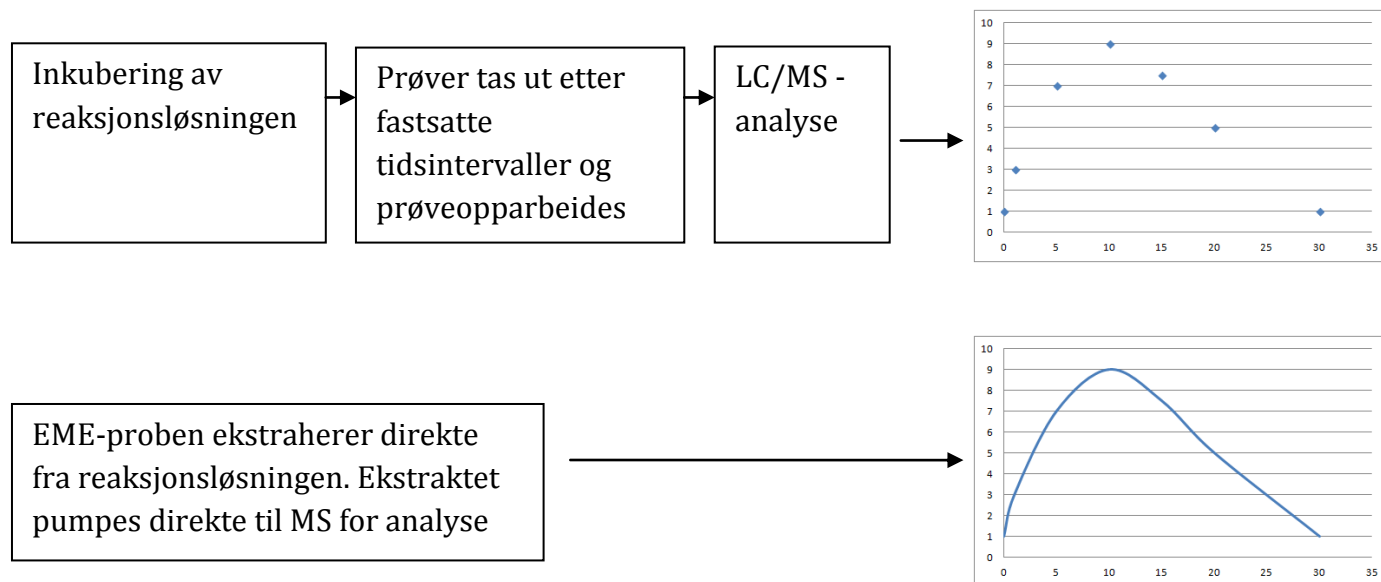
Tandem MS (MS-MS) er den mest målrettede og selektive metoden for å strukturkarakterisere ukjente og kjente metabolitter [35]. Fragmenteringsmønster som innhentes i tandem MS kan gi strukturspesifikk informasjon og kan lokalisere biotransformasjonen i molekylstrukturen. Trippelkvadrupol MS er mest vanlig og består av tre etterfølgende kvadrupoler, der kvadrupol 2 er en kollisjonscelle som fragmenterer ionene. Ved deteksjon av ukjente metabolitter låses kvadrupol 3 til et fragment med kjent m/z -verdi, og kvadrupol 1 skanner alle forløperne til dette fragmentet. Ved deteksjon av kjente metabolitter kan kvadrupol 1 låses til et kjent molekylion og kvadrupol 3 skanner alle fragmentene til dette molekylet. I MS/MS med MRM (Multiple Reaction Monitorering)-instillingen er instrumentet låst i kvadrupol 1 og 3, og dette gir svært gode kvantitative bestemmelser som er viktig for å kunne skille hovedmetabolittene fra de mindre metabolittene. Tandem MS kan også kombinere andre analysatorer som for eksempel kvadrupol og TOF eller kvadrupol og ionfelle. Kjernemagnetisk resonans (NMR) er et annet nyttig verktøy i strukturbestemmelse, spesielt i kombinasjon med MS. Andre tilnærminger for å karakterisere metabolitter er å bruke masseanalysatorer med høy oppløsning, for eksempel OrbiTrap og TOF.

Massenøyaktigheten til disse analysatorene er så høy at de i enkelte tilfeller kan identifisere bruttoformel for en uidentifisert forbindelse [34]. Problemet er at flere metabolitter kan ha samme bruttoformel og for sikker identifikasjon må man ta i bruk et kromatografisk separasjonstrinn og bruke en ekstern standard. En tredje tilnærming er å syntetisere den potensielle metabolitten og deretter sammenligne den syntetiserte og den genererte metabolitten med hensyn på retensjonstid og massespekter [34].

2.4 EME-probe direkte koblet til ESI-MS

EME-proben som ble utviklet i dette arbeidet skiller seg fra det tradisjonelle EME-oppsettet ved at akseptorfasen er en løsning i kontinuerlig bevegelse og ikke en stillestående fase. Akseptorløsningen som strømmer gjennom proben skaper en direkte forbindelse mellom metabolismen i reaksjonskammeret og deteksjonen i MS. I EME-probe/MS-systemet oppnås svært selektive ekstraksjoner og proben hindrer at interfererende komponenter fra reaksjonsløsningen transporteres til akseptorfasen. Ekstraktet kan derfor overføres direkte til MS uten et kromatografisk separasjonstrinn. Modersubstans og metabolitter vil være tilstede i ionekilden samtidig, og uten et separasjonstrinn bør ionesuppresjon undersøkes for hver analytt.

Figur 3 illustrerer skjematisk trinnene i in vitro metabolismestudier ved bruk av tradisjonell metode med off-line analyse og EME-probe med on-line MS-analyse.

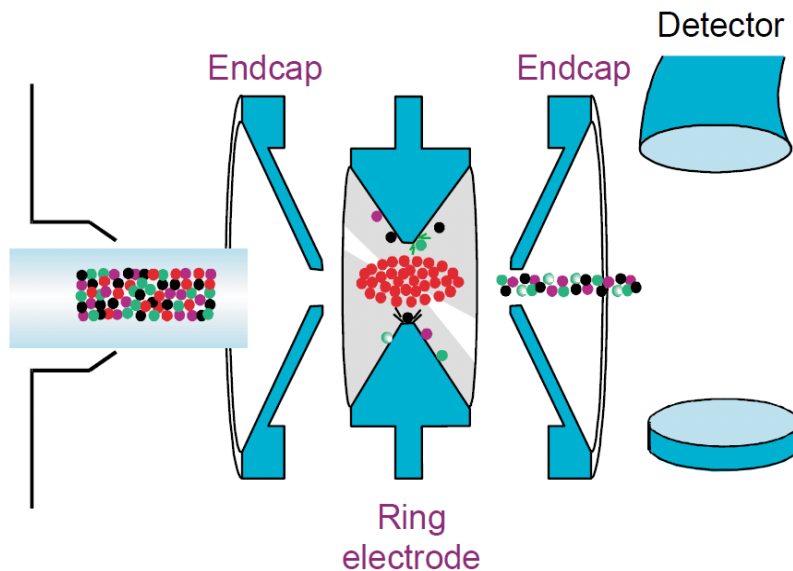


Figur 3 Skjematisk tegning av in vitro metabolismestudier: tradisjonell metode med off-line analyse (øverst) og ny teknologi med on-line analyse (nederst)

Tradisjonelle in vitro studier med off-line analyse er en prosess over flere trinn. Første trinn er inkubering av reaksjonsløsningen på et vannbad. Deretter stoppes metabolismereaksjonen etter fastsatte tidsintervaller, og prøver fra de ulike tidspunktene prøveopparbeides og analyseres på LC/MS. Analyseresultatene plottes til en tidsprofil ved å ekstrapolere mellom datapunktene for de ulike tidspunktene. I EME-probe/MS-systemet skjer hele prosessen fra inkubasjon til deteksjon i ett trinn. EME-probe/MS-systemet ekstraherer og detekterer kontinuerlig legemiddelrelatert materiale fra reaksjonsløsningen, og det oppnås en fullstendig tidsprofil for hele metabolismereaksjonen. EME-probe/MS-systemet kan på den måten innhente mer informasjon på kortere tid, sammenlignet med tradisjonelle metoder.

I dette arbeidet var fokuset på teknologien og ikke kartlegging av metabolisme, og en ionfelle ble ansett som tilstrekkelig for dette formålet. Ionfellen har langsom dataoppsamling og lav massenøyaktighet, men deteksjonssensitiviteten i full scan

modus er like god som OrbiTrap og TOF, og bedre enn en kvadrupol-masseanalysator [29]. Figur 4 illustrerer prinsippet for en ionefelle.

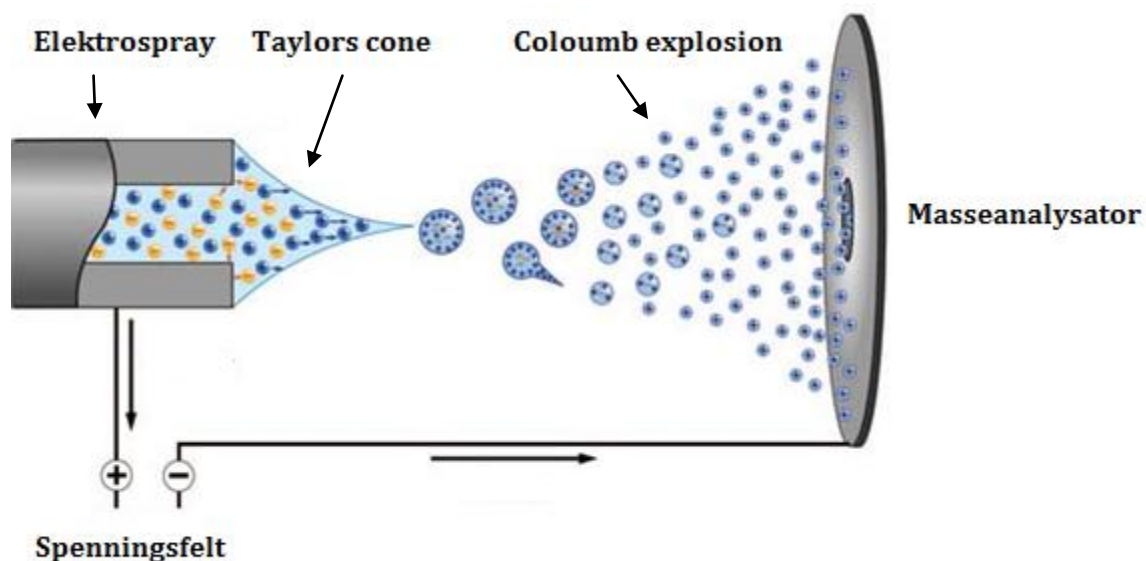


Figur 4 Prinsippskisse av en ionefelle [36]

En ionefelle består av to endcap elektroder og en sentral ringelektrode som samler opp alle ionene. Et elektrisk spenningsfelt fra en vekselstrømkilde, som gir strøm med varierende amplitude og fast frekvens, settes på ringelektroden. Alle ioner over en bestemt m/z -verdi, avhengig av amplituden, vil bevege seg i baner som holder ionene i ionefellen. Når amplituden øker vil ioner med økende masse bli ustabile og sendes videre til detektoren. De oppsamlede ionene som er utenfor det angitte m/z -intervallet sendes ut uten å bli registrert.

Før massebestemmelse kan finne sted i masseanalysatoren må analytten ioniseres. Elektrosprayionisering (ESI) er en myk ioniseringsteknikk og egner seg for metabolisemeanalyser hvor kraftig fragmentering av metabolittene er uønsket. ESI er også godt egnet for substanser som er termisk labile (for eksempel konjugerte fase II metabolitter) og forbindelser med minst en ioniserbar gruppe. ESI skjer ved atmosfæretrykk og ikke i vakuum, og for EME-probe/MS-systemet er det viktig at ioniseringen skjer utenfor instrumentet. En hjemmekonstruert elektrospray ble brukt i

dette oppsettet fordi akseptorløsningen har lavere hastighet enn det en tradisjonell, kommersiell elektrospaynål tillater. Prinsippet for ESI er illustrert i figur 5.



Figur 5 Prinsippskisse av elektrospayionisering [37]

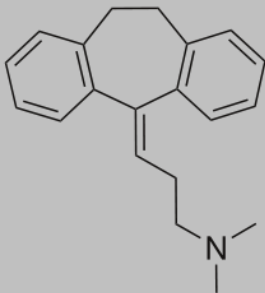
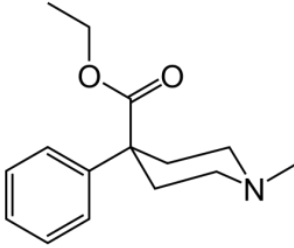
Et elektrisk spenningsfelt på 1-5kV blir påsatt mellom elektrospayen og en elektrode ved MS-inngangen. Akseptorløsningen som strømmer gjennom systemet setter seg som en dråpe ved spissen av elektrospayen. Når mengden av ladninger i dråpen stiger, øker frastøtningen mellom de enkelte ionene og dråpen får en kjegleform (Taylor cone). Dette fører til at væsken forstøves, og det dannes en sky av et stort antall, små dråper. Ved hjelp av en tørkegass fordamper gradvis væsken i dråpene slik at dråpestørrelsen reduseres og ladningstettheten øker, og ved Coloumb explosion deles dråpene i mindre dråper. Elektroden ved MS-inngangen har motsatt ladning av analytten, og ionene suges inn i masseanalysatoren. Masseanalysatoren vil deretter separere legemiddelioner og metabolittioner etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). En detektor registrerer mengden av ioner ved de ulike massene og plotter informasjonen i et massespekter.

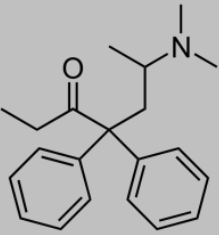
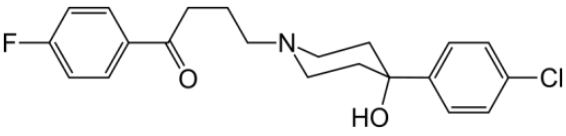
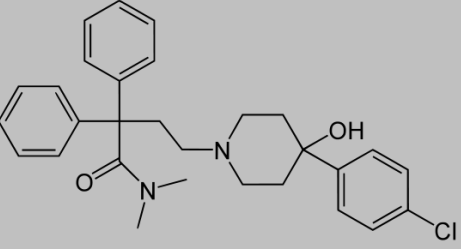
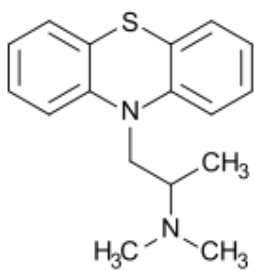
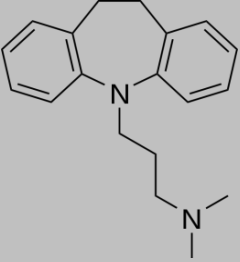
3 Eksperimentelt

3.1 Modellanalytter

Petidin, amitriptylin, metadon, haloperidol og loperamid ble brukt som modellanalytter for optimaliseringen av EME-proben. Videre ble amitriptylin, metadon, loperamid, prometazin og imipramin valgt som modellanalytter for metabolismestudiene. Valg av modellanalytter er basert på fysikalsk-kjemiske egenskaper og tidligere erfaringer ved bruk i EME [4]. Alle modellanalyttene er basiske og upolare, og pKa, molekylstruktur og log P er beskrevet i tabell 1.

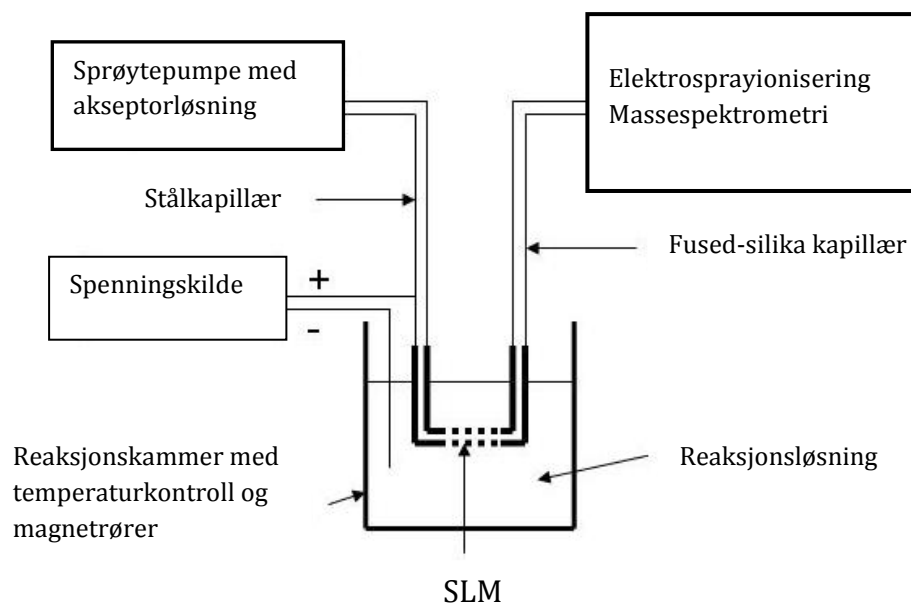
Tabell 1 Molekylstruktur, pKa og log P for modellanalyttene

Modellanalytt	Molekylstruktur [38]	pKa [38]	Log P [38]
Amitriptylin		9,76	4,81
Petidin		8,16	2,46

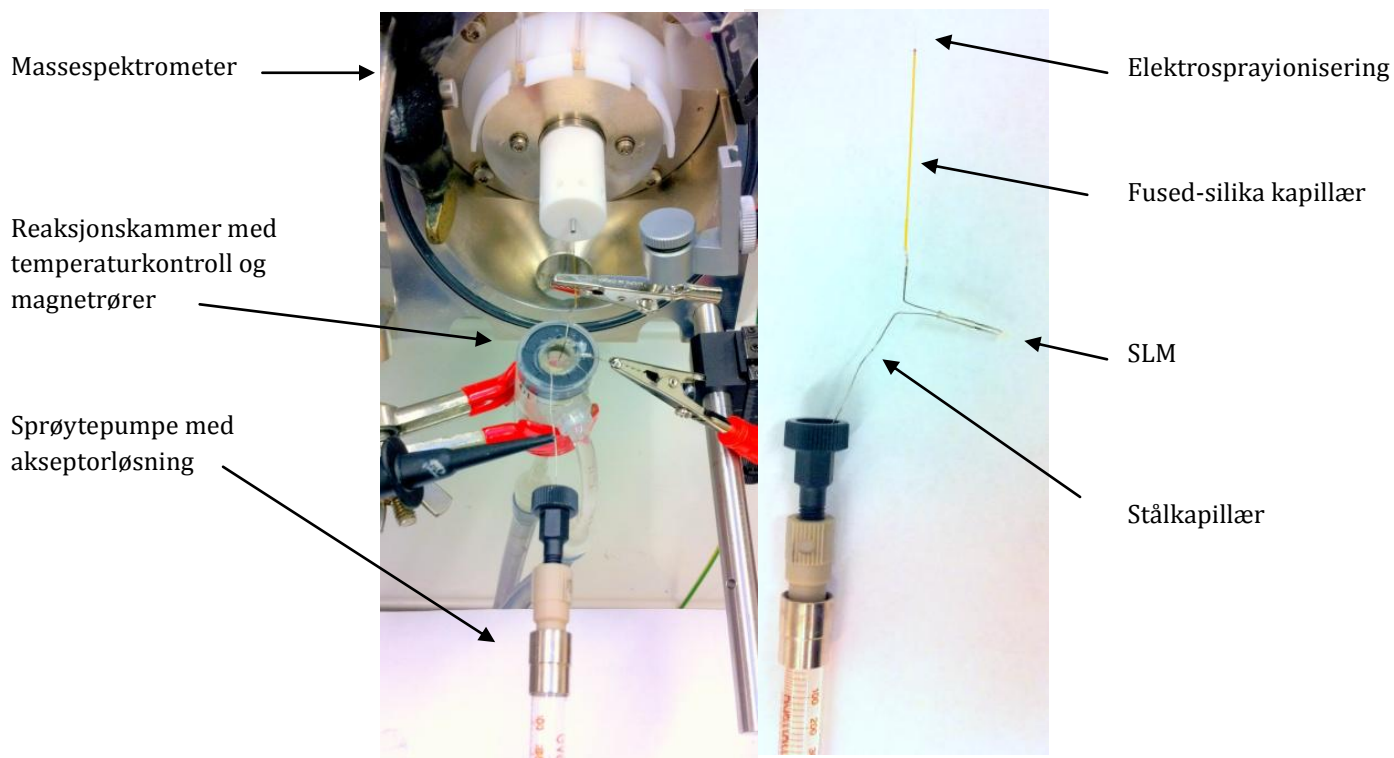
Metadon		9,12	5,01
Haloperidol		8,05	3,66
Loperamid		9,41	4,77
Prometazin		9,05	4,29
Imipramin		9,20	4,28

3.2 Ekstraksjonsbetingelser

En prinsippskisse og et illustrasjonsfoto av EME-probe/MS-systemet er vist i figur 6 og 7



Figur 6 Prinsippskisse av EME-probe/MS-systemet



Figur 7 Illustrasjonsfoto av EME-probe/MS-systemet

Ekstraksjonen skjedde over en porøs hullfiber av polypropylen. 5 μL av et organisk løsemiddel ble pipettert på fiberen med en mikropipette og umiddelbart skjedde en fargeforandring fra hvit til transparent som visuelt kunne observeres. Det organiske løsemiddelet ble immobilisert i fiberens porer og overskuddet ble tørket vekk.

Ekstraksjonscellen i hullfiberen ble lagd ved å utsette fiberen for varme fra en lighter slik at porene i hullfiberen rundt den veldefinerte ekstraksjonscellen ble lukket. Dermed ble kun ekstraksjonscellen etterlatt med åpne porer og ved immobilisering med et organisk løsemiddel fikk vi en SLM med veldefinert lengde. Et stålkapillær (nebuliseringsnål # G1946-20177, Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland) med 120 μm indre diameter og 260 μm ytre diameter ledet akseptorløsningen til SLM og utgjorde første del av EME-proben. Etter SLM ble hullfiberen koblet til et 7 cm langt fused-silika kapillær (i.d. 100 μm og o.d. 375 μm , Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) som utgjorde siste del av EME-proben. Hullfiberen ble koblet til kapillærene ved varmforsegling, og hullfiberen på hver side av ekstraksjonscellen fungerte som isolasjon for strømmen i reaksjonskammeret. Akseptorløsningen ble pumpet ut fra en mikrosprøytepumpe (KDS-100-CE, kdScientific, Holliston, MA, USA) med en 1000 μL gasstett #1001 sprøyte (Hamilton, Bonaduz, Sveits). Ekstraktet ble oppsamlet manuelt for off-line CE-analyse eller ført via en hjemmekonstruert elektrospy til MS for on-line analyse. Den eksterne spenningskilden var en ISO-Tech IPS-603 (RS Components Ltd, Northlands, Storbritannia). Katoden ble koblet direkte til stålkapillæret, mens anoden var en platinumtråd som ble plassert i reaksjonskammeret. Et 1500 μL eppendorfrør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ble brukt som reservoar for reaksjonsløsningen. Reaksjonsløsningen var under konstant omrøring med en Spinvane® magnetrører (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). For metabolismestudiene ble reservoaret omgitt av et hjemmebygd, temperaturkontrollert vannbad der vannet som sirkulerte rundt eppendorfrøret holdt en temperatur på 37 °C.

3.3 Analysebetingelser

Kapillærelektroforese ble utført med et Agilent Technologies HP^{3D} CE-instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland) med UV-deteksjon som ble operert på 200 nm. Separasjonen skjedde på et fused-silika kapillær (TSP075375 Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) med en effektiv lengde på 24,5 cm og en indre diameter på 75 µm. 25 mM natriumdihydrogenfosfat, justert til pH 2,7 med orto-fosforsyre, ble brukt som separasjonsbuffer og spenningen ble satt til 20 kV.

Massespektrometeret som ble benyttet var et Bruker-Esquire LC-MS ion felle (Bruker Daltronics Inc., Billerica, MA, USA). MS-analysene ble utført med betingelsene i tabell 2.

Tabell 2 Betingelser for MS-analysene

Ioniseringsmodus	Positiv
Kapillærspenning	-1500 V
Tørkegass	Nitrogen
Hastighet tørkegass	6 L/min
Temperatur tørkegass	200 °C
Scanhastighet	100 millisekunder
m/z-intervall for scanning	100 til 500 m/z

En hjemmekonstruert elektrospray ble brukt for å ionisere analyttene og ble koblet direkte til EME-probens utgang. Elektrosprøyen var et 75 µm i.d. fused-silika kapillær (TSP075375 Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Spraytuppen ble dannet ved å trekke kapillæret gjennom en flamme og behandle den ene enden med flussyre (HF) 48 % for å redusere diameteren og danne en spiss ende med sprayegenskaper. For å

hindre dødvolum ytterst på sprayen ble utsiden av spraytuppen dekket med et hydrofobt lag av SigmaCote® (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA). God spraystabilitet var viktig for å oppnå stabilt signal i MS, og sprayposisjonen ble kontinuerlig evaluert. Basert på tidligere erfaring ved bruk av den hjemmekonstruerte elektroprayen er det gunstig med en liten avstand fra MS-inngangen til sprayen for å hindre forstyrrelser. En desorpsjon elektroprayioniseringsnål (DESI-nål) ble koblet til MS-inngangen for å øke avstanden, og det ble observert at når sprayen var sentrert tett ved inngangen til DESI-nålen var signalet mest stabilt. Andre faktorer som påvirket spraystabiliteten var kapillærspenning, hastighet av akseptorløsningen, elektroprayens spiss og tørrgassens temperatur og hastighet. Under evalueringen av sprayposisjonen ble strømmen over væskemembranen kontinuerlig målt med et amperemeter for å undersøke om ustabil signal skyldtes ustabil spray eller ustabil ekstraksjon.

3.4 Løsninger

Stamløsninger på 1 mg/mL av petidin, amitriptylin, metadon, haloperidol og loperamid ble laget i 10 % (v/v) etanol. Løsningene ble oppbevart ved 4 °C og beskyttet mot lys. For optimaliseringsforsøkene ble stamløsningene fortynnet med 50 mM kalium fosfatbuffer pH 7,4 til en prøveløsning på 1 µg/mL med alle fem modellanalyttene. 60 mM HCOOH ble brukt som akseptorløsning. Stamløsning av intern standarden fenytrimetylammonium ble laget på samme måte som modellanalyttene og ble fortynnet i 60 mM HCOOH til en konsentrasjon på 20 µg/mL.

For metabolismeforsøkene ble det lagd separate stamløsninger med 35 µM amitriptylin, metadon, loperamid, prometazin og imipramin, 10 mM NADPH, 100 mM MgCl₂ og 1,0 M kaliumfosfatbuffer (pH 7,4) i ionebyttet vann. Reaksjonsløsningen for metabolismeforsøkene ble lagd slik at endelig konsentrasjon i reaksjonskammeret var som vist i tabell 3. NADPH og rottelevermikrosomer ble oppbevart ved -80 °C. Suspensjonen med rottelevermikrosomer ble sentrifugert etter opptining.

Tabell 3 Kjemisk sammensetning av reaksjonsløsningen

Legemiddel	3,5 μ M
Rottelevermikrosomer	1 mg/mL
MgCl ₂	5 mM
Fosfatbuffer (pH 7,4)	100 mM
NADPH	1 mM

3.5 Kjemikalier

Petidin hydroklorid, amitriptylin hydroklorid, metadon hydroklorid, haloperidol, loperamid hydroklorid, prometazin hydroklorid og imipramin hydroklorid ble alle anskaffet fra Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). 2-Nitrofenyloktyleter (NPOE), 2-nitrofenylpentyleter, 2,4-dimetyl-1-nitrobenzen, 1-etyl-2-nitrobenzen og fenyltrimetylammonium kom fra Fluka (Buchs, Sveits).

Suspensjon av rottelevermikrosomer (mannlige Sprague-Dawley, pooled; 20 mg protein per mL) kom fra BD Biosciences (San Jose, CA, USA) og β -nikotinamid adenin dinukleotid 2-fosfat (NADPH) ble anskaffet fra Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA).

3.6 EME-probe med on-line MS deteksjon for metabolismeforsøk

Før hvert metabolismeforsøk ble reaksjonskammeret fylt med 50 μ L av 100 mM MgCl₂, 100 μ L av 1,0 M kalium fosfatbuffer (pH 7,4) og 600 μ L ionebyttet vann. Magnetrøreren ble satt på 1000 rpm, og reaksjonsløsningen ble stående til ønsket temperatur ble oppnådd i løsningen. EME-proben ble satt ned i reaksjonskammeret, spenningskilden ble skrudd på og sprøytepumpen begynte å pumpe akseptorløsning gjennom systemet.

60 mM HCOOH ble valgt som akseptorløsning både fordi maursyre er kompatibel med ESI-MS og fordi lav pH er viktig for den elektrokinetiske transporten. Ved lav pH vil de basiske modellanalyttene være på ionisert form slik at de ikke blir tilbakeekstrahert i SLM. Sprayposisjon og MS-signal ble kontrollert og stabilisert før 100 µL av 35 µM legemiddelsubstans ble tilsatt reaksjonskammeret. Da signalet for legemiddelet nådde stabil platåverdi ble 50 µL av 20 mg/mL rottelevermikrosomer tilsatt. Da signalet igjen stabiliserte seg ble 100 µL av 10 mM NADPH tilsatt og metabolismereaksjonen startet. De neste 30-60 min ble MS operert i full scan modus for å detektere modersubstansen og potensielle metabolitter.

3.7 EME-probe med off-line CE deteksjon for optimaliseringsforsøk

I optimaliseringsforsøkene ble reaksjonskammeret fylt med en prøveløsning med de fem modellanalyttene fortynnet i fosfatbuffer, og istedenfor direkte kobling til MS ble ekstraktet oppsamlet manuelt og analysert på CE med UV-deteksjon. Ekstraksjonstiden ble satt til 5 minutter og alle ekstraksjonene ble repetert tre ganger.

Fenyltrimetylammonium ble brukt som intern standard og ble tilsatt akseptorløsningen før alle ekstraksjonene. Intern standard var viktig for å korrigere for variasjon i injeksjonsvolum under CE-analysen og for å korrigere for tap av akseptorløsning under ekstraksjonen forårsaket av fordampning. Intern standarden var også en referansetopp i elektroferogrammet som markerte endring i elektroosmotisk flow og sikret korrekt identifikasjon av de separerte toppene.

3.8 Beregning av utbytte, oppkonsentrering og halveringstid

3.8.1 Utbytte

Utbytte, R , defineres som andel analytt fra donorløsningen som ekstraheres over i akseptorløsningen, og beregnes etter ligning 4.

$$R = \frac{n_{A,final}}{n_{D,initial}} \cdot 100\% = \left(\frac{C_{A,final}}{C_{D,initial}} \right) \cdot \left(\frac{V_A}{V_D} \right) \cdot 100\% \quad (4)$$

Der $n_{D,initial}$ er antall mol analytt i donorløsningen ved ekstraksjonens start og

$n_{A,final}$ er antall mol i akseptorløsningen ved avsluttet ekstraksjon.

$C_{D,initial}$ er konsentrasjon av analytt i donorløsning ved ekstraksjonens start, $C_{A,final}$ er konsentrasjon av analytt i akseptorløsningen ved avsluttet ekstraksjon, V_A er volum av akseptorløsning og V_D er volum av donorløsning.

3.8.2 Oppkonsentrering

Oppkonsentrering er konsentrasjon av analytt etter ekstraksjon i forhold til konsentrasjon av analytt før ekstraksjon. Oppkonsentreringsfaktoren, EF, beregnes etter ligning 5.

$$EF = \frac{C_{A,final}}{C_{D,initial}} \quad (5)$$

3.8.3 Halveringstid

Halveringstid, $t_{1/2}$, defineres som tiden det tar før konsentrasjonen av et legemiddel synker til det halve. Halveringstid beregnes etter ligning 6 og bygger på en antagelse om at legemiddelets metabolisme følger 1. ordens kinetikk.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}} \quad (6)$$

Der k_{el} er elimineringens hastighetskonstant.

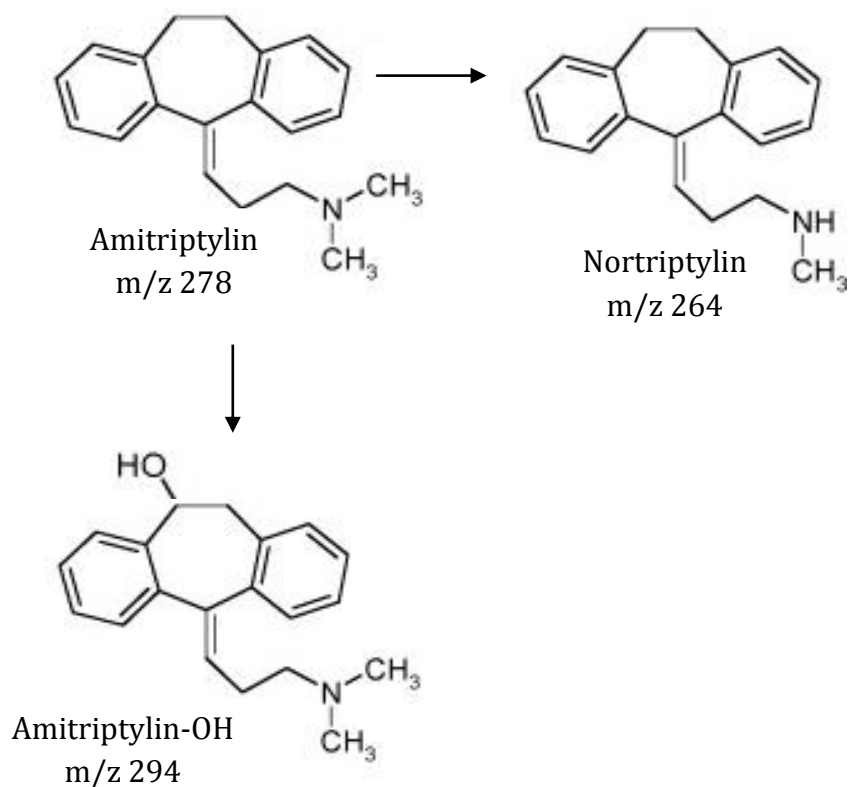
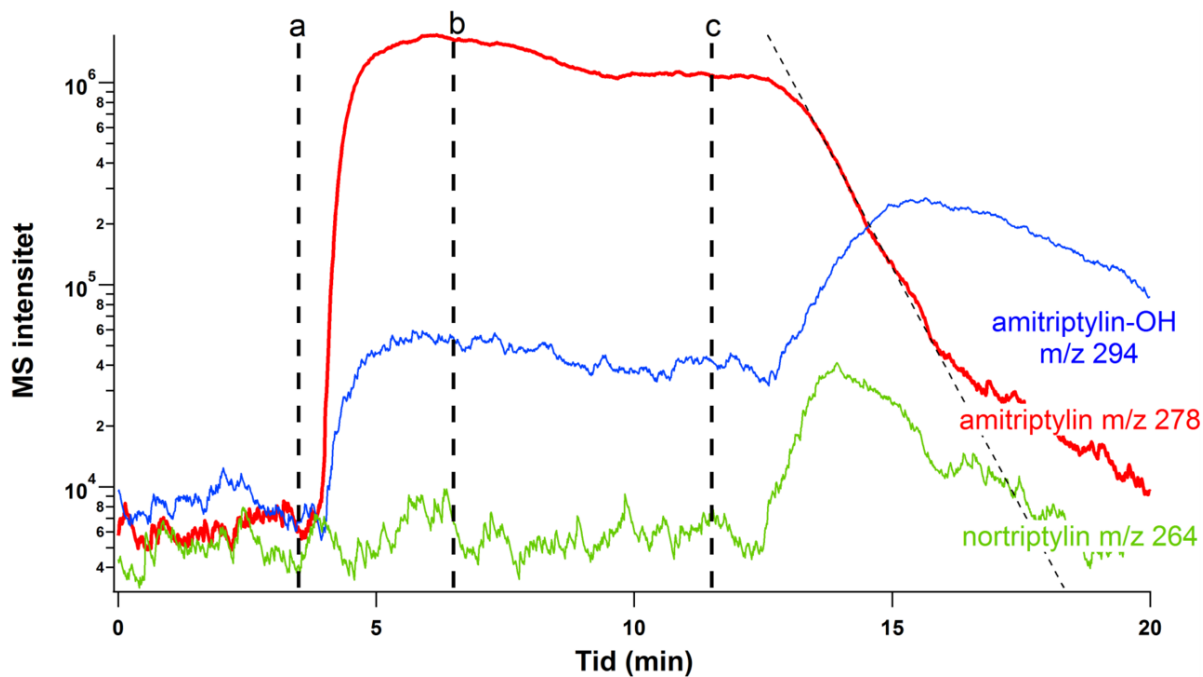
4 Resultat og diskusjon

4.1 Prinsipp for EME-probe/MS-systemet

En elektromembranekstraksjonsprobe (EME-probe) direkte koblet til elektroprayoniserings-massespektrometri (ESI-MS) ble utviklet for anvendelse i in vitro metabolismestudier. En prinsippsskisse for EME-probe/MS-systemet er illustrert i figur 6. Legemiddelsubstansene ble metabolisert in vitro i et temperaturkontrollert reaksjonskammer på 37 °C som var under kontinuerlig omrøring. Reaksjonskammeret var åpent for omgivelsene for å sikre at metabolismereaksjonen skulle få fri tilgang til oksygen, og pH og temperatur ble justert til fysiologiske forhold. Metabolismen skjedde i en 1 mL reaksjonsløsning med uorganiske salter, fosfatbuffer (pH 7,4), rottelevermikrosomer og kofaktor. Rottelevermikrosomer er avhengig av en reduserende kofaktor for enzymatisk aktivitet, og NADPH ble brukt i dette arbeidet for å studere CYP-mediert metabolisme. EME-probens rolle var å ekstrahere legemiddelet og de mest hydrofobe metabolittene fra reaksjonsløsningen, over en SLM med NPOE immobilisert i porene, til en akseptorløsning med 60 mM maursyre. Akseptorløsningen strømmet kontinuerlig gjennom proben med en hastighet på 3 µL/min og overførte ekstraktet direkte til ESI-MS for deteksjon. En positiv elektrode ble plassert i reaksjonskammeret og en negativ elektrode i akseptorløsningen, og ved å legge et elektrisk spenningsfelt over SLM migrerte basiske legemidler og metabolitter elektrokinetisk mot elektrodene med motsatt ladning. Elektrodene var koblet til en ekstern spenningskilde som enkelt kunne justere spenningsnivået for å styre ekstraksjonens effektivitet og selektivitet. Den påsatte spenningen diskriminerte nøytrale forbindelser fordi de ikke kan migrere elektrokinetisk, og anioniske forbindelser på grunn av polariseringen i spenningsfeltet. Polare komponenter ble ikke ekstrahert fordi de ikke er løselige i en SLM med NPOE. I tillegg utgjorde væskemembranen et fysisk filter som hindret passasje av partikulært materiale fra suspensjonen med rottelevermikrosomer. Akseptorløsningen inneholdt derfor kun basiske substanser med lav polaritet. EME-proben hindret på den måten at buffersalter, proteiner og kofaktor fra reaksjonsløsningen skulle kontaminere MS og gi

ionesuppresjon. En EME-probe direkte koblet til ESI-MS ga mulighet til å følge de komposisjonelle endringene i reaksjonskammeret samtidig som reaksjonen fant sted. Signalene i MS ble en profil som viste hvordan legemiddelet ble omdannet til metabolitter som funksjon av tid.

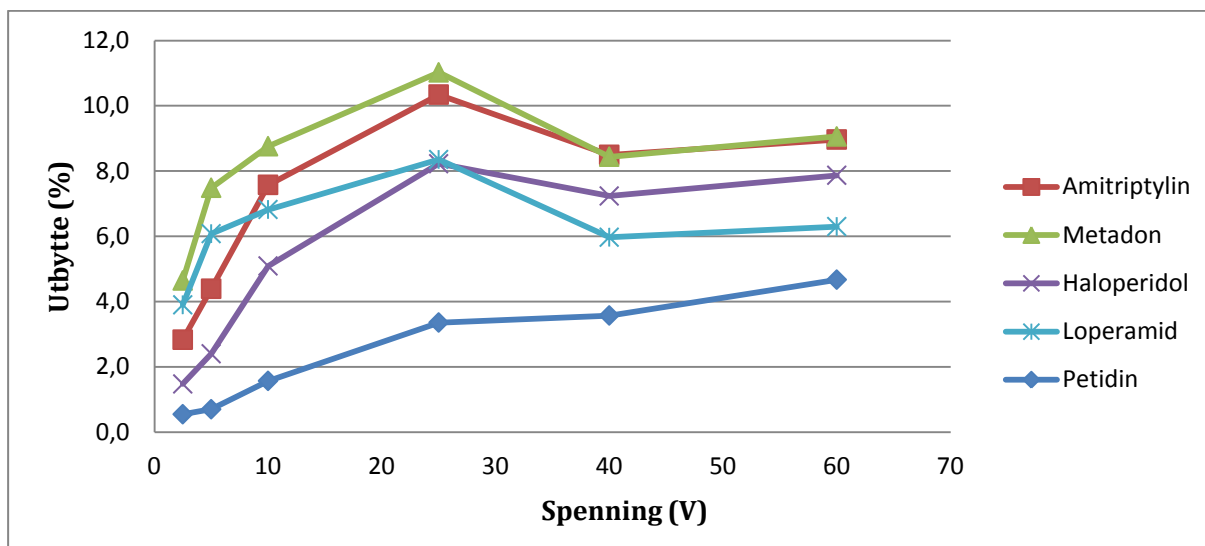
Et eksempel på en tidsprofil for en metabolismereaksjon er illustrert i figur 8 hvor det anti-depressive legemiddelet amitriptylin ble brukt som modellsubstans. Legemiddelets startkonsentrasjon var 3,5 μM , og EME-proben ble operert med spenning på 2,5 V og SLM med lengde på 1 mm. Amitriptylin ble metabolisert raskt og hele metabolismereaksjonen skjedde på 20 min. De første minuttene var reaksjonskammeret fylt med en reaksjonsløsning av kalium fosfatbuffer og MgCl_2 , og ingen signal for amitriptylin m/z 278 ble observert. Etter 3,5 min (punkt a, figur 8) ble amitriptylin tilsatt reaksjonskammeret og signalet for m/z 278 økte kraftig. Da signalet nådde en stabil platåverdi, etter 6,5 min, ble rottelevermikrosomer tilsatt (punkt b, figur 8) og en liten reduksjon i signalet ble observert. Årsaken er at amitriptylin delvis proteinbindes med enzymene, og mengden fritt legemiddel reduseres. Etter 12 min ble NADPH tilsatt som kofaktor (punkt c, figur 8) og metabolismereaksjonen startet. MS ble operert i full scan i m/z -området 100 til 500 for å kunne observere signalene til amitriptylins metabolitter. Signaler for metabolittene nortriptylin (m/z 264) og hydroksey-amitriptylin (m/z 294) økte gradvis. Nortriptylin nådde en maksimalkonsentrasjon i reaksjonskammeret etter 2,3 min, mens maksimalkonsentrasjonen for hydroksey-amitriptylin ble observert etter 3,8 min. Signalet for m/z 278 falt ettersom konsentrasjonen av amitriptylin i reaksjonskammeret ble redusert når legemiddelet ble omdannet til metabolitter. Eksperimentet ble repetert tre ganger og halveringstiden til amitriptylin ble estimert til 1,6 min med et relativt standardavvik på 32 %. Dette stemmer overens med tidligere rapporterte data for metabolisme av amitriptylin i EME på chip [15].



Figur 8 *In vitro* metabolismeprofil og antatte metabolismeveier for amitriptylin.
 a) Tilsats av amitriptylin b) Tilsats av rottelevermikrosomer c) Tilsats av NADPH
 Ekstraksjonsspennning: 2,5 V, lengde SLM: 1 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet
 akseptorløsning: 3 μ L/min.

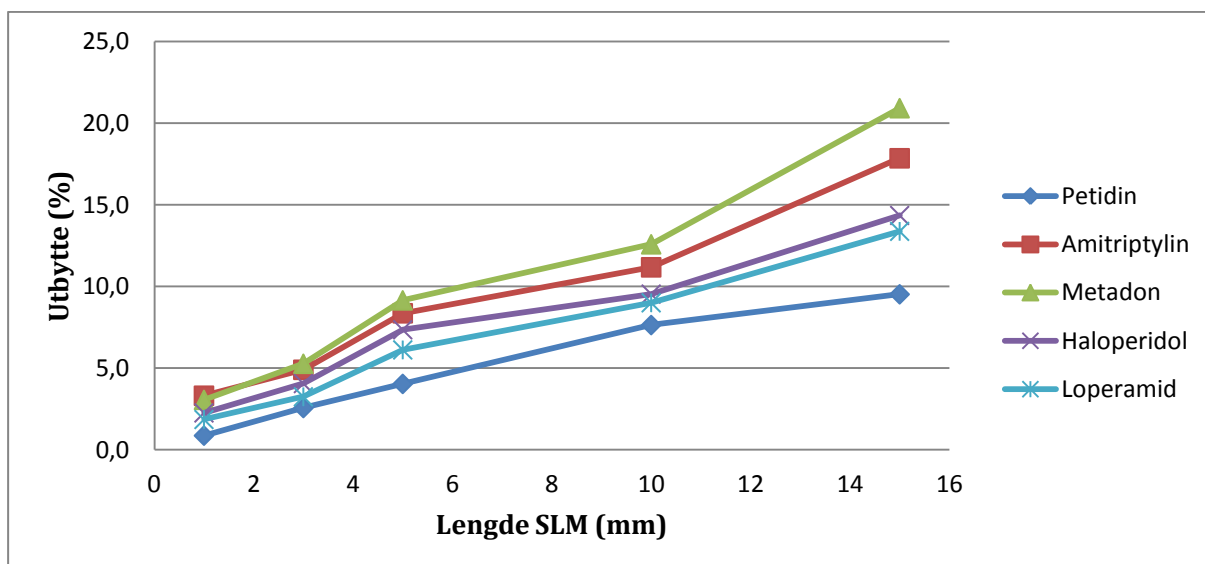
4.2 Optimalisering av EME-probens ekstraksjonseffektivitet

I en serie eksperimenter ble EME-proben karakterisert for å få en grunnleggende forståelse for parametere som påvirker ekstraksjonseffektiviteten. Under optimaliseringsforsøkene ble reaksjonskammeret fylt med en prøveløsning med 1 µg/mL av modellanalyttene petidin, amitriptylin, metadon, haloperidol og loperamid fortynnet i fosfatbuffer (pH 7,4). Rottelevermikrosomer, kofaktor og uorganiske salter ble ikke tilsatt reaksjonskammeret for å unngå komposisjonelle endringer under optimaliseringen, og det skjedde derfor ingen metabolismereaksjon. Ekstraktet ble samlet opp manuelt og analysert på CE med UV-deteksjon. For øvrig var betingelsene de samme som i metabolismeforsøkene. Innledningsvis ble fire ulike organiske løsemidler undersøkt for å finne en egnet organisk væskemembran. Ved ekstraksjon med 2,4-dimetyl-1-nitrobenzen og 1-etyl-2-nitrobenzen skjedde en rask stigning i strømmen som ble målt over SLM og bobledannelse kunne observeres. Økt strøm er et tegn på ustabilitet i systemet, og dette er beskrevet nærmere i kapittel 4.2.1. Membranstabilitet. 2-Nitrofenylpentyleter og 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) utviste god membranstabilitet og ga relativt like ekstraksjonsutbytter. NPOE ble valgt basert på erfaring ved bruk at dette løsemiddelet som SLM for ekstraksjon av basiske, hydrofobe legemidler [9]. En 5 mm lang hullfiber med NPOE immobilisert i porene ble brukt i videre optimaliseringsforsøk. Først ble effekten av ekstraksjonsspennning undersøkt og spenningsavhengigheten ble observert for spenninger fra 2,5 V til 60 V. Som illustrert i figur 9 økte ekstraksjonseffektiviteten med økende spenning inntil en maksimalverdi ved rundt 25 V. Ytterligere økning i spenning påvirket ikke ekstraksjonsutbyttet. Økning i ekstraksjonseffektivitet frem til en platåverdi er observert også i tidligere EME-studier [18], og kan forklares ut i fra teorien om at distribusjonskoeffisienten øker med økende spenning inntil distribusjonskoeffisienten ikke lenger er det begrensede trinnet for ekstraksjonen og ekstraksjonen i stedet begrenses av transport til og fra SLM [17].



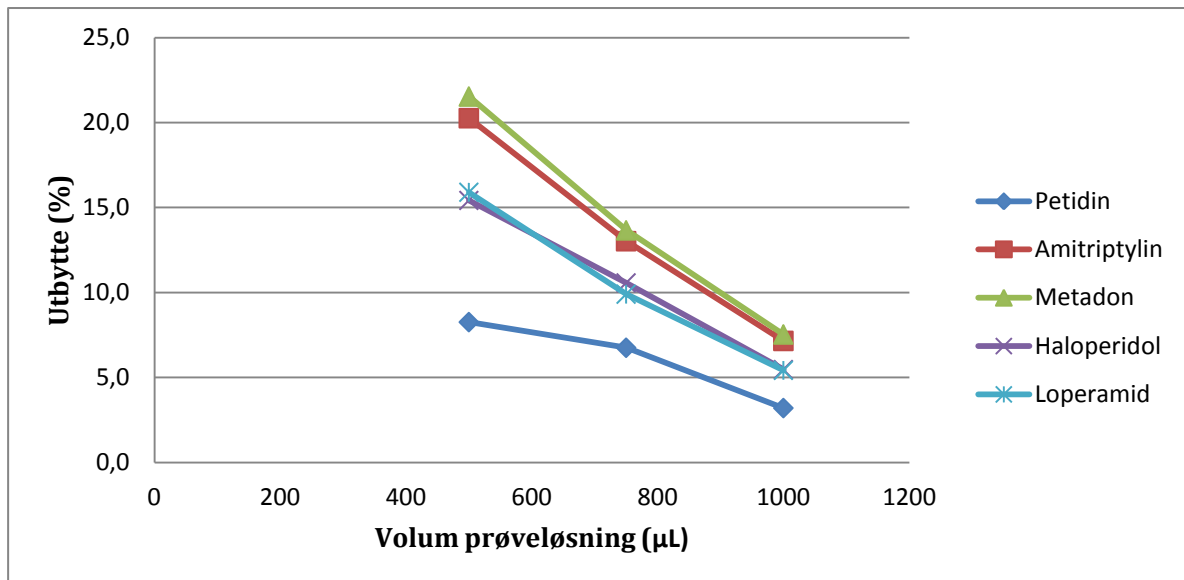
Figur 9 Utbytte versus ekstraksjonsspenning. Ekstraksjonsspenning: 2,5 V – 60 V, lengde SLM: 5 mm, volum prøveløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min

Deretter ble proben karakterisert med hensyn på lengde av SLM. SLM med lengde på 1 mm til 15 mm ble undersøkt, og ekstraksjonsutbyttet økte proporsjonalt med økende lengde på SLM. Sammenhengen mellom overflatearealet av SLM og ekstraksjonseffektivitet er beskrevet i figur 10 og samsvarer med en teoretisk modell som nylig er utviklet for EME generelt [27].



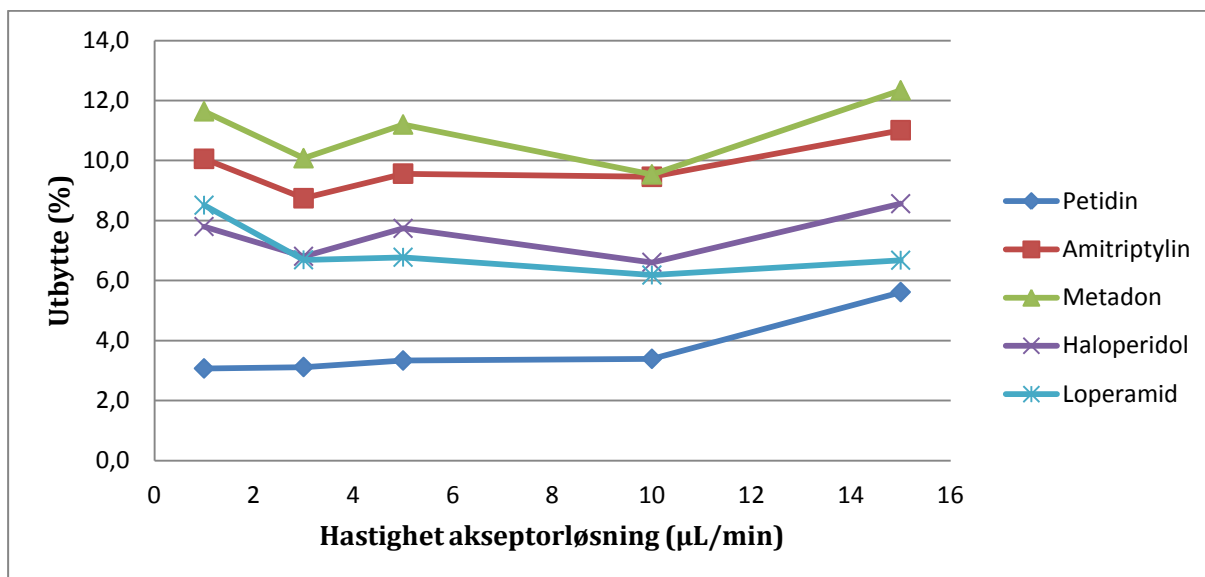
Figur 10 Utbytte versus lengde på SLM. Lengde SLM: 1 mm – 15 mm, ekstraksjonsspenning: 25 V, volum prøveløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min

Deretter ble volumet av prøveløsningen optimalisert. Eksperimenter med volum på 500 μL , 750 μL og 1000 μL ble utført, og som illustrert i figur 11 ble ekstraksjonsutbyttet redusert ettersom prøveløsningsvolumet økte. Dette er i tråd med en teoretisk modell som nylig er publisert om EME [27].



Figur 11 Utbytte versus volum av prøveløsningen. Volum prøveløsning: 500 μL -1000 μL , ekstraksjonsspenning: 25 V, lengde SLM: 5 mm, hastighet akseptorløsning: 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tilslutt ble det utført eksperimenter med å variere hastigheten av akseptorløsningen i intervallet 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ til 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, og resultatet er beskrevet i figur 12. Forsøket viste at ekstraksjonseffektiviteten var uavhengig av akseptorløsningens hastighet og dette ble også observert for EME på chip [16].



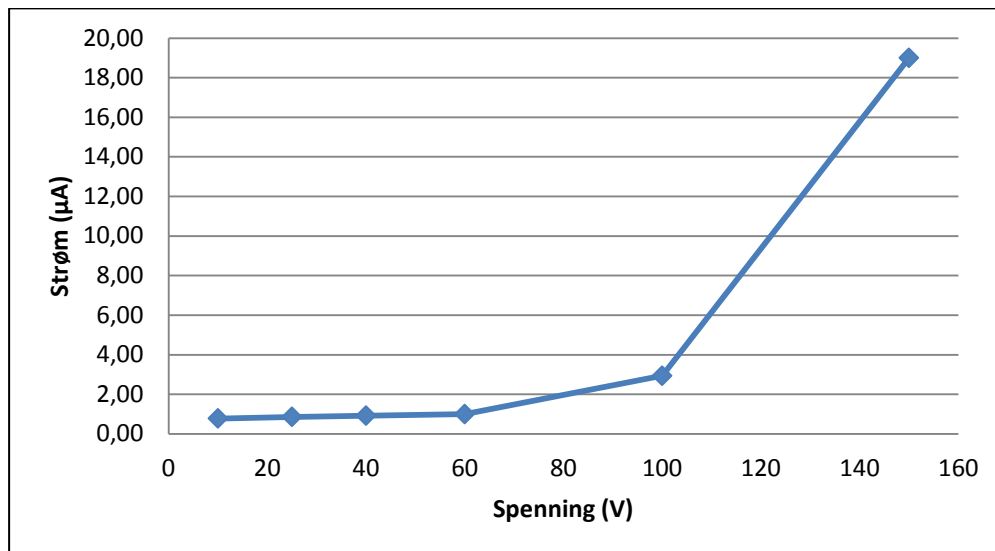
Figur 12 Utbytte versus hastighet av akseptorløsningen. Hastighet akseptorløsning: 1 µL/min -15 µL/min, ekstraksjonsspenning: 25 V, lengde SLM: 5 mm, volum prøveløsning: 1000 µL.

Optimaliseringsforsøkene bekreftet viktige egenskaper ved EME-proben, nemlig at parameterne spenning, prøveløsningsvolum og lengde av SLM kan utnyttes til å styre ekstraksjonseffektiviteten.

4.2.1 Membranstabilitet

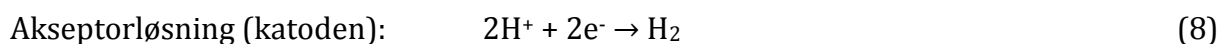
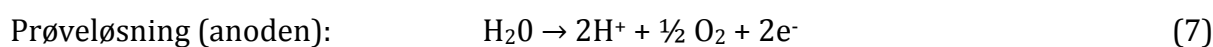
Strømmen som løper i systemet er en god indikator på væskemembranens stabilitet og beskriver transport av analytt og bakgrunnsioner gjennom SLM. Gjennom alle forsøkene ble strømmen over væskemembranen målt med et amperemeter og strøm i området 0 – 2 µA indikerte god stabilitet. Figur 13 beskriver hvordan strømflyten endrer seg med økende spenning i intervallet 10 V til 150 V. Fra 10 V til 60 V var systemet stabilt og strømflyten økte proporsjonalt med den pålagte spenningen etter Ohms lov. I dette intervallet var det en lineær sammenheng mellom strøm og spenning med en $r^2 = 0,9935$. Ved ekstraksjon på 100 V og oppover ble systemet ustabil og strømmen økte drastisk. Strømnivået begynte å fluktuere, i noen tilfeller opp mot 500 µA, og bobleformasjon oppstod. Boblene kunne observeres rundt elektroden, i kapillæret som ledet akseptorløsningen fra SLM og ved å følge med på plutselige fall i strømnivået på amperemeteret. Den organiske væskemembranen kollapset og ved visuell undersøkelse

av SLM var det tydelig at det organiske løsemiddelet var blitt vasket vekk. pH i akseptorløsningen og prøveløsningen ble målt med pH-indikatorpapir før og etter ekstraksjonen, og en liten pH-endring ble observert.



Figur 13 Strømmen som løper i systemet med økende spenning i intervallet 10 V til 150 V.

SLM utgjør den elektriske motstanden i systemet, fordi ledningsevnen i den organiske væskemembranen er mye lavere enn i akseptor- og prøveløsningen. Hvis membranen punkterer reduseres den elektriske motstanden mellom elektrodene og strømflyten øker. Økt strømflyt kan føre til kraftig elektrolyse ved elektrodene, og denne redoksreaksjonen kan beskrives med ligning 7 og 8:



Elektrolyse fører til dannelse av hydrogengass og oksyngengass, og gasdannelsen gir bobleformasjon i systemet og ustabil ekstraksjon. Elektrolyse kan også føre til uønskede pH endringer ved anoden og katoden. Endring av pH i prøveløsningen kan redusere pH – kontrollen i reaksjonskammeret under metabolismereaksjonen. Endring av pH i akseptorløsningen kan føre til deprotonering av analytten, tilbakeekstraksjon inn i SLM og redusert utbytte. Elektrolyse og pH-endring har ikke påvirket resultatene i dette

arbeidet. Alle ekstraksjonene ble utført med lav spenning, og den høye elektriske motstanden over SLM ga lav og stabil strømflyt. Tidligere studier har bekreftet at de valgte modellanalyttene ikke blir utsatt for elektrokjemisk degradering i EME [17].

4.2.2 Carry-over effekt

Carry-over effekt i systemet ble undersøkt ved å ekstrahere 2 x 5 min med 10 mM HCl rett etter en ekstraksjon med de fem modellanalyttene. Analyse av ekstraktet fra vask med HCl viste detekterbare topper i første ekstrakt (0-5 min) og ingen topper i andre ekstrakt (5-10 min). Dette tyder på at enkelte av modellanalyttene ble fanget i SLM og dermed kunne påvirke resultatet i den påfølgende ekstraksjonen. 5 min ekstraksjon med 10 mM HCl ble standard vaskeprosedyre for å hindre carry-over effekt og ble gjort umiddelbart etter hver ekstraksjon i alle optimaliseringsforsøkene. Med denne vaskeprosedyren mellom hver ekstraksjon kunne samme SLM bli brukt i mange påfølgende ekstraksjoner på samme dag. Ny SLM ble immobilisert med NPOE hver morgen for å hindre dag-til-dag variasjon og carry-over effekt fra dagen før.

4.2.3 Omrøring i prøveløsningen

Eksperimenter ble utført med og uten omrøring i prøveløsningen, og forsøkene viste at ekstraksjonsutbyttet ble betraktelig redusert uten omrøring. Dette er i tråd med tidligere studier med EME og bekrefter at kontinuerlig omrøring er viktig for å hindre at diffusjon i prøveløsningen er det hastighetsbestemmende trinnet [39]. Effekten av omrøring avhenger av prøvevolumet og i store prøvevolumer der feltstyrken er svakere reduseres utbyttet betraktelig uten omrøring. Alle ekstraksjonene i dette arbeidet ble utført med omrøring for å øke massetransporten fra prøveløsningen til SLM, og for å sikre god blanding av de ulike komponentene i reaksjonskammeret. Det ble også gjort en evaluering av omrøringshastigheten, og det ble observert at ved høye hastigheter oppstod uønsket bobleformasjon og ved lave hastigheter ble ekstraksjonsutbyttet påvirket. Et kompromiss på 1000 rpm ble valgt for alle eksperimentene i dette arbeidet.

4.2.4 Ekstraksjonskinetikk

EME av basiske legemidler er mest effektiv ved lav pH i prøveløsningen. Økende ioniseringsgrad gir forbedret elektrokinetisk migrasjon, og ved to pH-enheter lavere enn pKa er basiske analytter nesten fullstendig protonert. I dette arbeidet ble det ekstrahert med 50 mM fosfatbuffer pH 7,4 som bakgrunns elektrolytt. Modellanalyttene har pKa-verdier mellom 8,1 – 9,7 og de vil ved fysiologisk pH være helt eller delvis ioniserte. Til tross for at pH var relativt nær pKa-verdien for flere av modellanalyttene utviste EME-proben høy grad av effektivitet. Studier har vist at EME med basiske analytter kan utføres i pH-området 4-11, også ved pH-forhold der analytten er delvis uionisert [40]. Årsaken til dette er at dissosiasjonslikevekten raskt og kontinuerlig endres ettersom ioniserte analytter ekstraheres fra prøveløsningen. Petidin har gode elektroforetiske egenskaper og migrerte raskest av de fem modellanalyttene i CE. I optimaliseringsforsøkene hadde petidin langsommere ekstraksjonskinetikk enn de andre modellanalyttene, og det tyder på at petidin har lavere distribusjonsratio mellom NPOE og den vandige prøveløsningen. Petidin er den minst upolare av de fem modellanalyttene med en log P på 2,46. I tillegg til log P er polart overflateareal og antall ladninger avgjørende for distribusjon inn i en organisk væskemembran. Metadon med log P på 5,01 utviste motsatte egenskaper og hadde raskest kinetikk av de fem modellanalyttene.

4.3 Teoretiske betraktninger for optimal monitorering av in vitro metabolisme

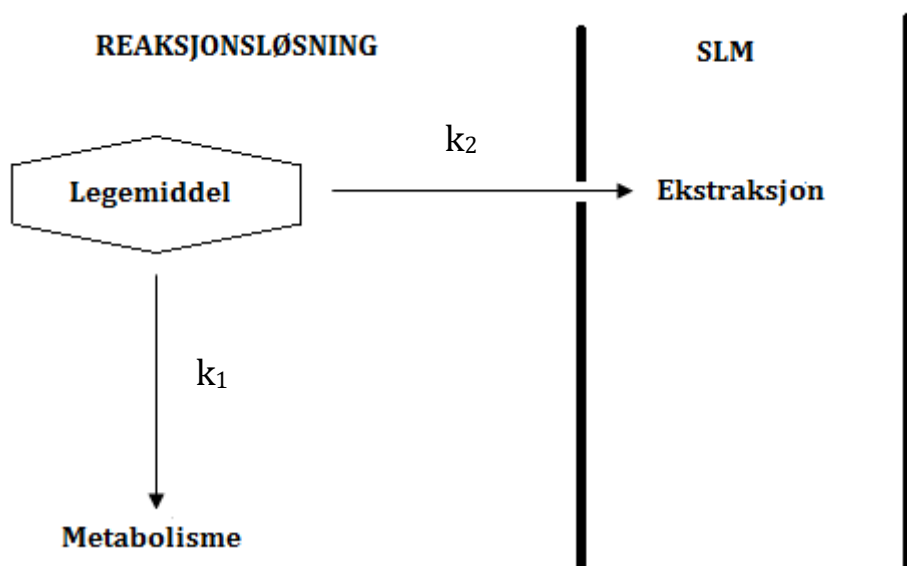
EME-probe/MS-systemet i den nåværende konfigurasjonen kan monitorere in vitro metabolisme av legemidler. Troverdige målinger av kinetiske data krever at systemet opereres under optimale betingelser. De teoretiske forutsetningene for dette er:

- a) Ekstraksjonsprosessen bør ikke påvirke totalkonsentrasjonen i reaksjonsløsningen i betydelig grad.
- b) Ekstraksjonsprosessen bør ideelt sett oppkonsentrere prøven før deteksjon.
- c) Ekstraksjonsprosessen bør ideelt sett være rask sammenlignet med den metabolske prosessen for å kunne måle høye hastighetskonstanter.

d) Den metabolske prosessen bør ikke påvirke ekstraksjonskinetikken i betydelig grad.

I bioanalyse generelt tilstrebes ofte ekstraksjoner med høyt utbytte, tett opp mot 100 %, for å kunne detektere analytten på lave konsentrasjonsnivåer. I dette arbeidet var fokuset på å ekstrahere så lite som mulig for å hindre at totalkonsentrasjonen i reaksjonsløsningen skulle påvirkes i nevneverdig grad (punkt a). I optimaliseringsforsøkene ble det bekreftet at ekstraksjonsspenning, lengde av SLM og volum av reaksjonsløsningen kontrollerte ekstraksjonseffektiviteten, og ved å justere disse betingelsene kan forutsetningene i punkt a og b tilfredsstilles. I noen tilfeller vil kravet om oppkonsentrering bli sett bort i fra for å tilfredsstille punkt a. Teoretiske modeller bekrefter at EME er betraktelig raskere enn tilsvarende metoder for prøveopparbeidelse, som for eksempel LPME. Den elektroforetiske komponenten i massetransporten i EME er viktig for å kunne tilfredsstille forutsetningen i punkt c. Punkt d er vanskeligere å evaluere, men bør tas med i vurderingen.

I tilfeller der ekstraksjonsprosessen er så effektiv at forutsetningen i punkt a ikke oppfylles, kan en matematisk justering korrigere totalreaksjonens hastighetskonstant. Ekstraksjonsprosessen er ansett som en reaksjon som følger pseudo-første ordens kinetikk. Ved lav substratkonsentrasjon vil ikke enzymene være mettet og metabolismereaksjonen vil også følge pseudo-første ordens kinetikk. Den metabolske prosessen og ekstraksjonsprosessen kan derfor betraktes som to parallelle pseudo-første ordens kinetikkreaksjoner som illustrert i figur 14. Hastighetskonstanten til reaksjonen som helhet blir summen av hastighetskonstanten til den metabolske prosessen (k_1) og ekstraksjonsprosessen (k_2).

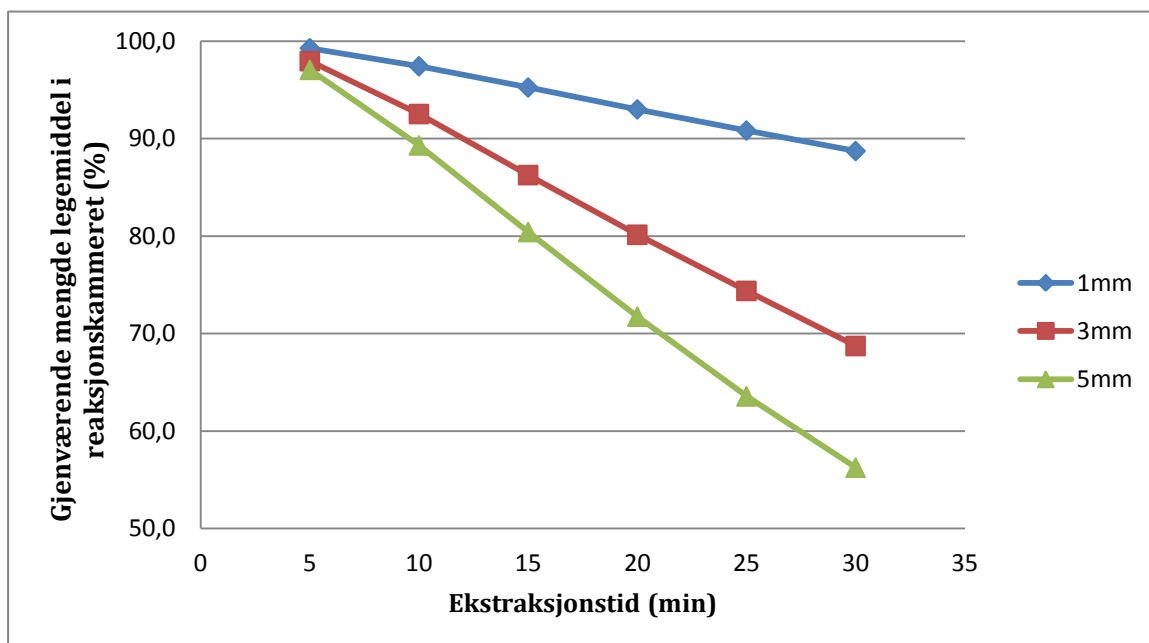


Figur 14 Prinsippskisse av den metabolske prosessen og ekstraksjonsprosessen som to parallelle kinetikkreaksjoner

4.4 Optimalisering av EME-probe/MS-systemet for in vitro metabolismestudier

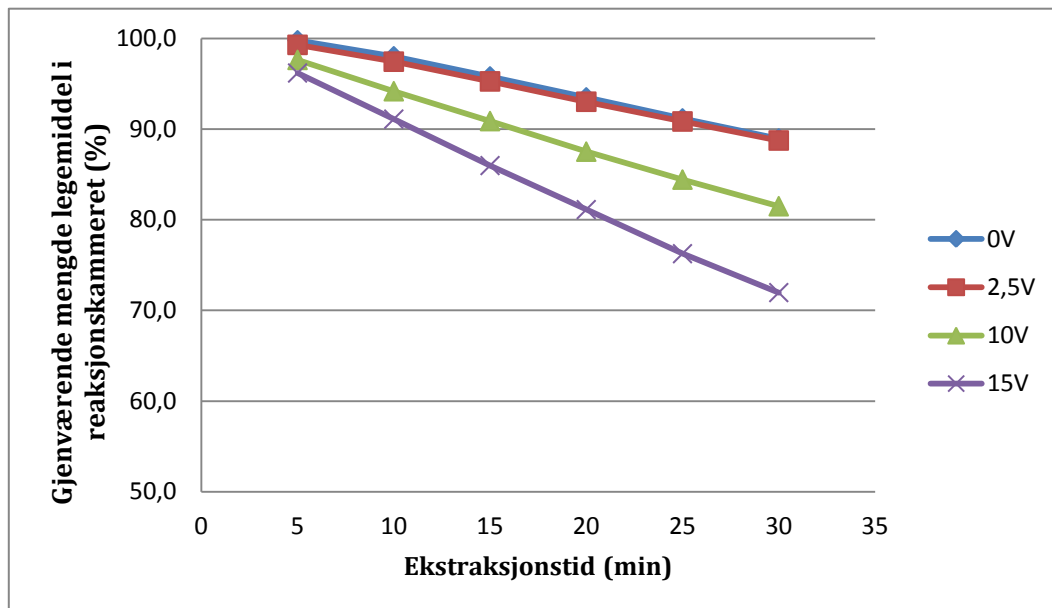
Basert på de teoretiske betraktningene i kapittel 4.3. og observasjonene fra karakteriseringen av EME-proben, ble EME-probe/MS-systemet optimalisert for anvendelse i in vitro metabolismestudier. Optimaliseringens formål var å finne ekstraksjonsbetingelser som ga troverdig måling av kinetiske data. Tidligere studier med EME på chip hadde et dobbel-flow system der prøveløsning og akseptorløsning var i kontinuerlig bevegelse slik at SLM hele tiden kom i kontakt med ny, frisk prøveløsning [16]. EME-probe/MS-systemet er et enkelt-flow system med en stillestående prøveløsning, og ved kontinuerlig ekstraksjon fra en prøveløsning over tid vil legemiddelkonsentrasjonen gradvis reduseres. Under optimaliseringen av EME-proben ble det beregnet utbytter på mellom 2 % og 22 % etter 5 minutters ekstraksjon. Med de samme betingelsene i et metabolismeforsøk på 30-60 min, vil ekstraksjonsprosessen betraktelig redusere totalkonsentrasjonen i prøveløsningen. Under slike forhold vil kinetiske data være vanskelig å måle fordi legemiddelkonsentrasjonens fall i tidsprofilen

er forårsaket av reduksjon i tilgjengelig legemiddel i reaksjonskammeret i tillegg til legemiddelets omdannelse til metabolitter. En viktig tilnærming for å hindre at reaksjonskinetikken forstyrres eller påvirkes er "myk" ekstraksjon. Dette innebærer en justering av ekstraksjonsbetingelsene slik at kun en liten mengde legemiddel blir ekstrahert fra reaksjonskammeret per tidsenhet. I en serie eksperimenter ble "myke" betingelser karakterisert for å undersøke omfanget av legemiddeltap over tid ved å justere parameterne spenning, lengde av SLM og prøveløsningsvolum. Eksperimentene ble utført ved å ekstrahere fra en prøveløsning med amitriptylin fortynnet i fosfatbuffer (pH 7,4) over et tidsintervall som er representativt for en metabolismereaksjon. Ekstraksjonsbetingelsene forøvrig var de samme som i optimaliseringen av EME-proben. Figur 15 beskriver gjenværende mengde legemiddel i reaksjonskammeret som funksjon av tid ved kontinuerlig ekstraksjon i 30 min med ulik lengde på SLM. Lengden ble variert mellom 1 mm og 5 mm, og det viste seg at lengden var svært avgjørende for ekstraksjonseffektiviteten. Ved å redusere lengden fra 5 mm til 1 mm ble 30-40 % mindre legemiddel fjernet fra reaksjonskammeret etter 30 min. For å oppnå "myk" ekstraksjon ble en SLM med lengde på 1mm brukt i videre eksperimenter.



Figur 15 Gjenværende mengde amitriptylin i reaksjonskammeret etter 30 minutters ekstraksjon med lengde SLM på 1mm, 3mm og 5mm. Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, volum prøveløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

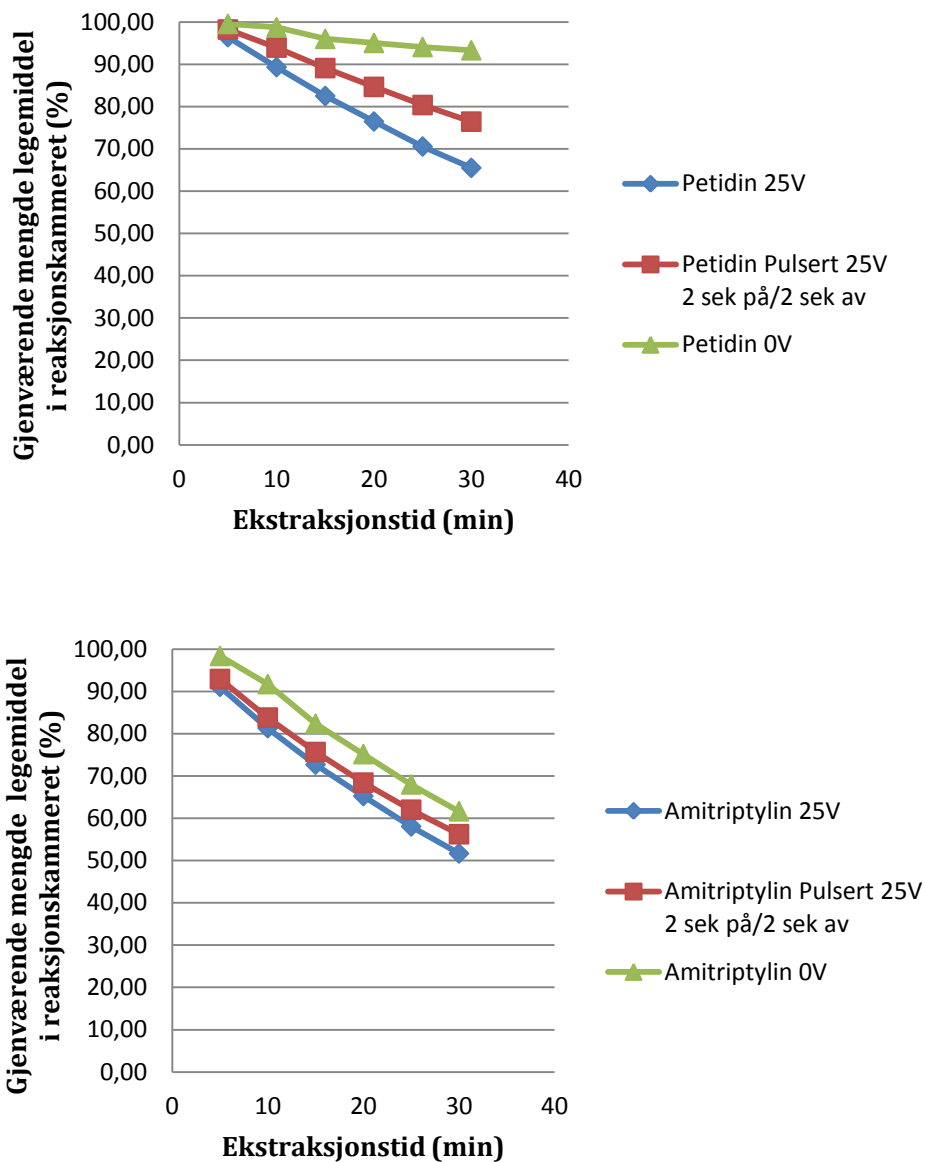
Deretter ble spenning karakterisert og resultatet er illustrert i figur 16 hvor gjenværende mengde legemiddel i reaksjonskammeret er plottet som funksjon av tid ved ulike spenninger. Spenningen ble variert mellom 0 V og 15 V, og etter 30 min ble 15-20 % mindre legemiddel fjernet fra reaksjonskammeret med 2,5 V sammenlignet med 15 V.



Figur 16 Gjenværende mengde amitriptylin i reaksjonskammeret etter 30 minutters ekstraksjon med ekstraksjonsspenning fra 0 V til 15 V. Lengde SLM: 1 mm, volum prøveløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

Nedjustering av spenningen til 2,5 V er viktig for å oppnå "myke" ekstraksjonsbetingelser, og med en justerbar, ekstern strømkilde kan lav spenning lett oppnås. Et alternativ til ekstraksjon med kontinuerlig lav spenning er ekstraksjon med pulsert spenning. Pulsert spenning innebærer at spenningen skrur av og på etter fastsatte tidsintervaller, og ekstraksjonen veksler mellom aktive og inaktive perioder. Fordelen med å pulsere spenningen fremfor å ekstrahere med lav spenning er at effektiviteten går ned, men ikke selektiviteten. I tillegg vil ekstraksjonseffektiviteten ved 2,5 V være sensitiv for variasjon i ledningsevne i systemet fordi ekstraksjonsutbyttet gradvis øker fra 0 V til 15 V før et stabilt platånivå oppnås (figur 9). Effekten av å pulsere spenningen ble undersøkt ved å utføre 30 minutters ekstraksjoner fra en prøveløsning med petidin og amitriptylin som modellanalytter. Først ble det ekstrahert med

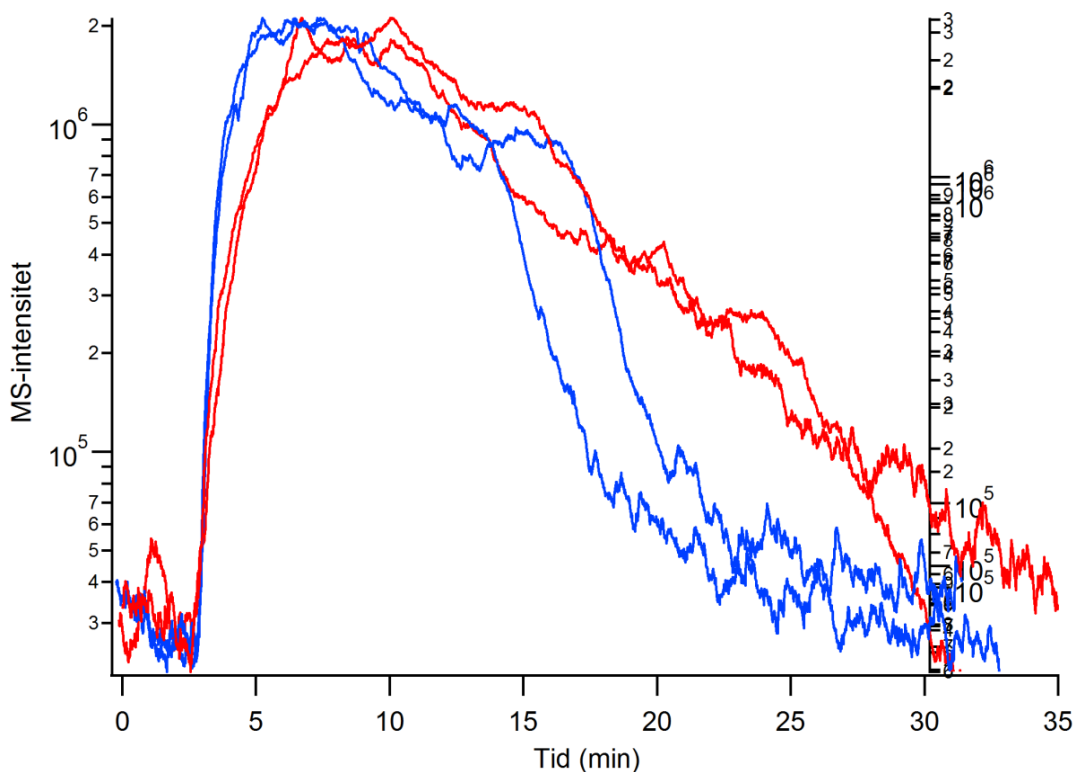
kontinuerlig spenning med 25 V, deretter med 25 V som var pulsert med 2 sek på/2 sek av og tilslutt med 0 V. Ekstraksjonsutbyttene ble som illustrert i figur 17, og ekstraksjonseffektiviteten med pulsert spenning var som forventet høyere enn 0 V og lavere enn 25 V.



Figur 17 Ekstraksjon av petidin (øverst) og amitriptylin (nederst) med en ekstraksjonsspenning på 0 V, pulsert spenning med 25 V og kontinuerlig spenning med 25 V. Lengde SLM: 5 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

I figur 16 og 17 kan det tydelig observeres nevneverdig ekstraksjon også ved 0 V for begge modellanalyttene. Ved ekstraksjon med fysiologisk pH i prøveløsningen vil analytter med pKa-verdi nær pH 7,4 være delvis uioniserte. Uten spenning i systemet vil pH-gradienten mellom prøveløsningen (pH 7,4) og akseptorløsningen (pH 2-3) føre til at de uioniserte analyttene passivt diffunderer over SLM til akseptorløsningen. Omfanget av passiv diffusjon avhenger av analyttens kjemiske egenskaper, og ekstraksjonseffektiviteten ved 0 V var svært ulik for de to modellanalyttene. Amitriptylin ble kraftig ekstrahert ved 0 V, og forskjellen i utbytte mellom pulsert og kontinuerlig spenning var liten fordi ekstraksjon skjedde i aktive og inaktive perioder. Petidin viste mindre evne til å diffundere passivt uten spenning, og forskjellen i ekstraksjonseffektivitet mellom pulsert og kontinuerlig spenning var derfor større. Pulsert spenning kan være en strategi for å oppnå "myke" ekstraksjonsbetingelser, men kontinuerlig spenning ble valgt for videre metabolismestudier.

En annen observasjon i figur 16 er at ekstraksjonseffektiviteten ved 0 V og 2,5 V er relativt lik. I EME-probe/MS-systemet, hvor det tilstrebes "myke" ekstraksjonsbetingelser, tilsier dette at ekstraksjon uten spenning er tilfredsstillende. Dette ble undersøkt nærmere ved å utføre metabolismeforsøk av amitriptylin ved 2,5 V og 0 V, og figur 18 illustrerer tidsprofilene med og uten spenning.

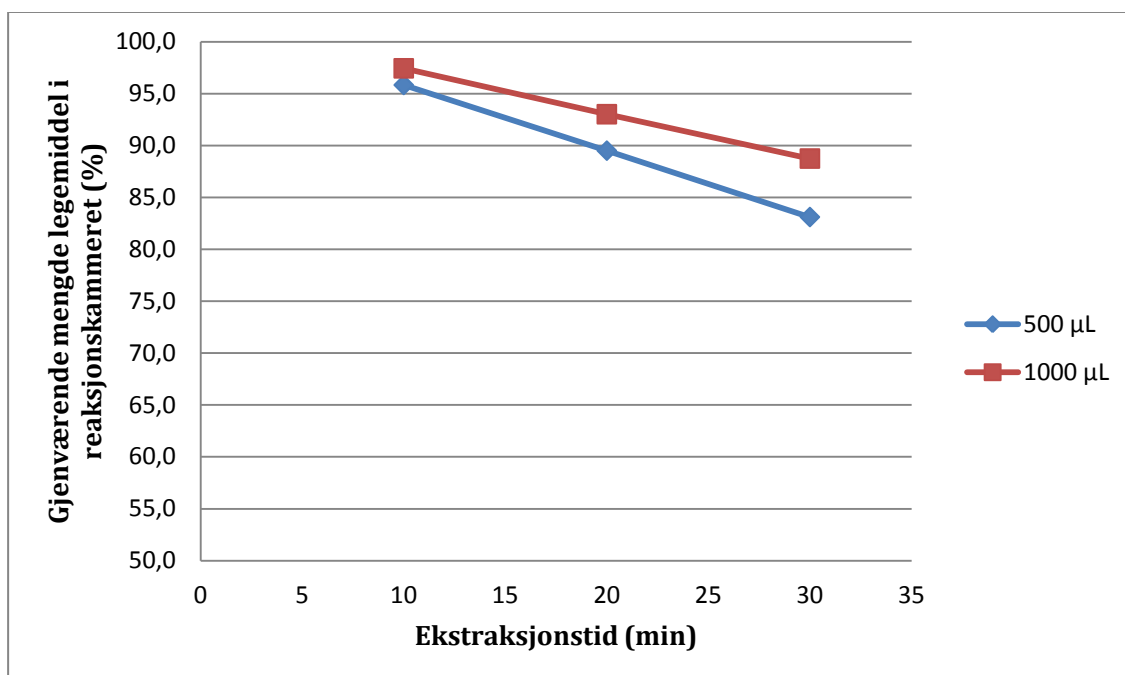


Figur 18 *In vitro* metabolismeprofil av amitriptylin med ekstraksjonsspennning på 0 V (rød graf) og 2,5 V (blå graf). Lengde SLM: 3 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

Til tross for at ekstraksjonseffektiviteten var tilsvarende med 2,5 V og 0 V kommer det tydelig frem av figur 18 at transporttiden gjennom SLM er mye raskere med spenning. Ved 0 V er det ingen elektrokinetisk massetransport over SLM og langsom migrering ved passiv diffusjon gir forsinket respons i MS. Ekstraksjon med spenning gir hurtig massetransport gjennom SLM og en rask respons på komposisjonelle endringer i reaksjonskammeret. En annen utfordring med å ekstrahere uten spenning (LPME) i metabolismestudier er tilbakeekstrahering fra akseptorløsningen til prøveløsningen. Teoretiske modeller for distribusjon av analytt i LPME og EME beskriver hvordan analytten ved starten av ekstraksjonen fanges i SLM før gjennombrudd i akseptorløsningen, og akkumuleringen er betraktelig større i LPME [27]. Høy konsentrasjon av analytt i SLM kombinert med en rask metabolsk prosess, som gir betydelig reduksjon i legemiddelkonsentrasjon i prøveløsningen, kan føre til tilbakeekstrahering. Under metabolismestudier er det derfor viktig at

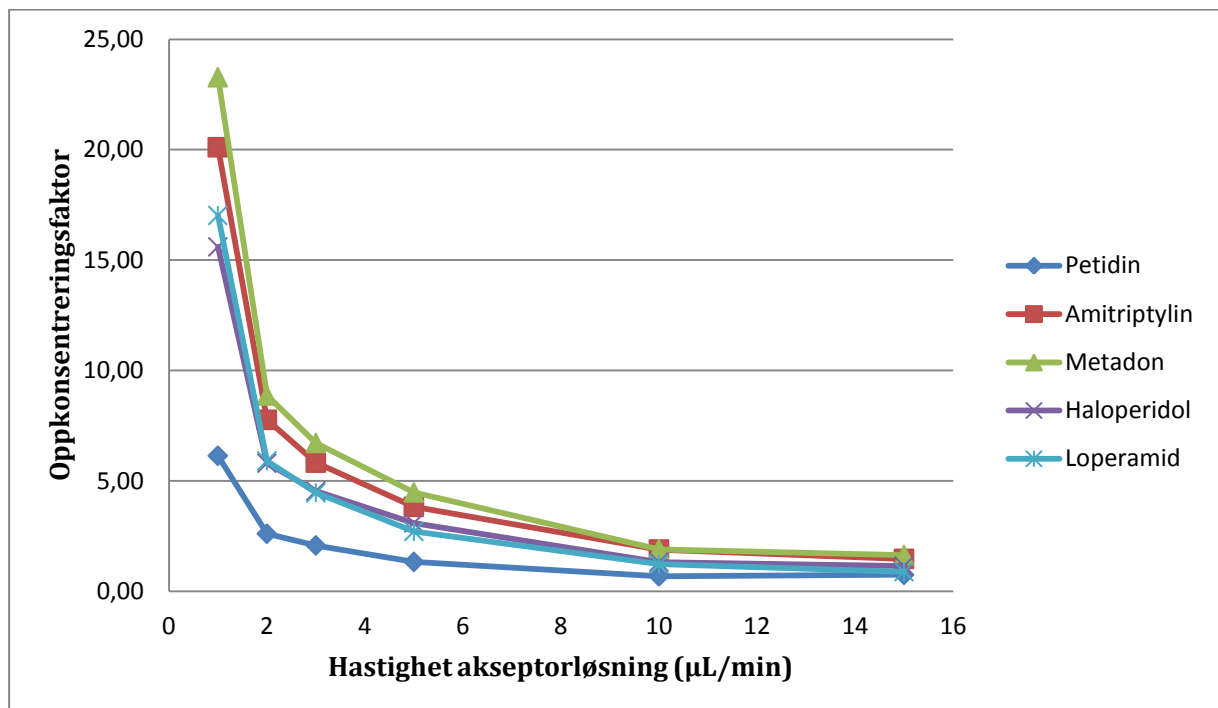
ekstraksjonsprosessen er rask både for å kunne måle høye metabolske hastighetskonstanter og for å hindre tilbakeekstrahering. Spenning er avgjørende for rask kinetikk og optimal monitorering av metabolismestudier oppnås med EME og ikke LPME.

Deretter ble gjenværende mengde legemiddel i reaksjonskammeret undersøkt ved å ekstrahere fra prøveløsningsvolum på 500 μL og 1000 μL . Resultatet er illustrert i figur 19 og som forventet ble det ekstrahert mer effektivt fra et lite prøveløsningsvolum. "Myke" ekstraksjonsbetingelser oppnås best med store prøveløsningsvolum, og 1000 μL ble valgt for videre metabolismestudier. I et tilleggforsøk ble det utført ekstraksjoner fra et prøveløsningsvolum på 1500 μL og tap av legemiddel fra reaksjonskammeret etter 30 min var ytterligere redusert. I bioanalyse tilstrebes det å kunne ekstrahere fra små prøvevolum så ytterligere økning i prøveløsningsvolum er kun aktuelt i tilfeller der andre strategier for å redusere ekstraksjonseffektiviteten ikke oppnår tilfredsstillende resultat.



Figur 19 Gjenværende mengde amitriptylin i reaksjonskammeret etter 30 minutters ekstraksjon med prøveløsningsvolum på 500 μL og 1000 μL . Lengde SLM på 1 mm, ekstraksjonsspenning: 2,5 V, hastighet akseptorløsning: 3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tilslutt ble hastigheten av akseptorløsningen optimalisert med hensyn på optimale betingelser for monitorering av legemiddelmetabolisme. Oppkonsentrering påvirkes av volumforskjellen mellom prøveløsning og akseptorløsning, og for EME-probe/MS-systemet vil hastigheten av akseptorløsningen i stor grad avgjøre hvor godt oppkonsentrert ekstraktet blir før deteksjon. Figur 20 beskriver hvordan oppkonsentreringen ble redusert med økende hastighet.



Figur 20 Oppkonsentrering av prøveløsningen med økende hastighet av akseptorløsningen fra 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ til 15 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Ekstraksjonsspening: 25 V, lengde SLM: 5 mm, volum prøveløsning: 1000 μL .

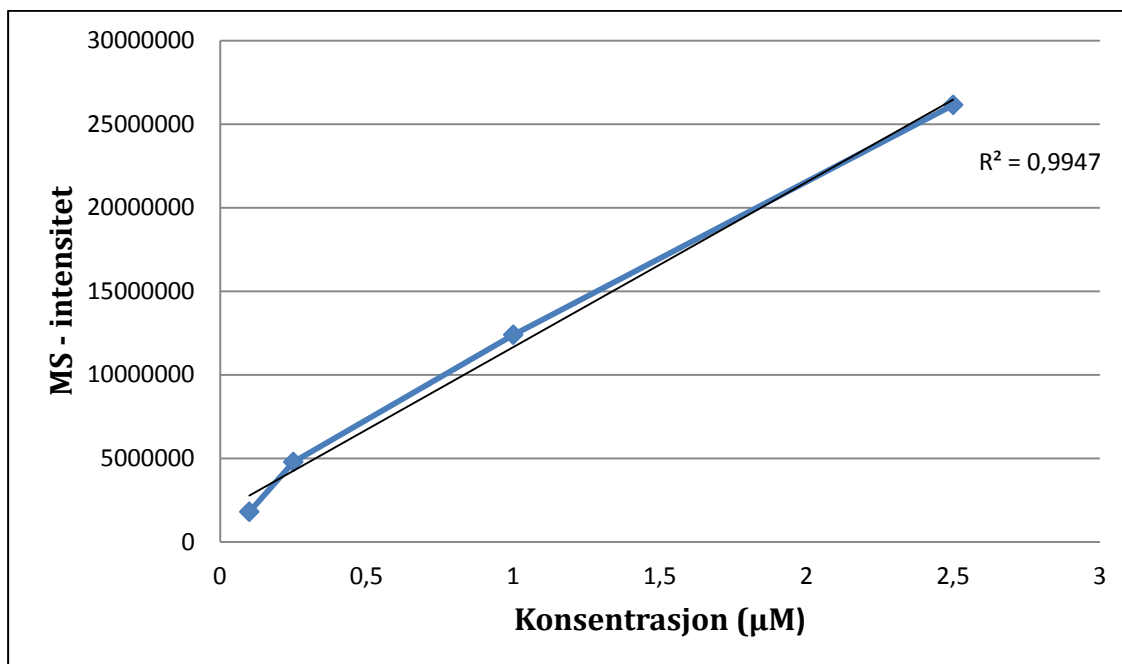
For å oppnå god oppkonsentrering før deteksjon, bør hastigheten av akseptorløsningen være så lav som mulig. Samtidig vil lav hastighet gi en stor forsinkelse fra ekstraksjon i reaksjonskammeret til signal i MS, og en uønsket lang responstid på komposisjonelle endringer i reaksjonskammeret. En rask respons på ned mot noen sekunder ble oppnådd ved høye hastigheter, men fordi mottrykket i systemet samtidig økte ble membranstabiliteten redusert. I noen tilfeller ble det observert at SLM ble presset ut av porene i hullfiberen og MS-signalet ble påvirket av prøvematrixen. Som et kompromiss mellom oppkonsentrering og responstid ble hastigheten satt til 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ for videre

metabolismestudier. I EME-probe/MS-systemet gir det en forsinkelse på rundt 30 sek, som tilsvarer transporttiden over SLM og transporttiden i kapillæret frem til MS.

Optimaliseringen av EME-probe/MS-systemet bekreftet at ekstraksjonsbetingelsene er svært avgjørende for optimal monitorering av in vitro metabolisme. I den nåværende konfigurasjonen er ekstraksjonens påvirkning på totalkonsentrasjonen i prøveløsningen spesielt kritisk. Eksperimentene demonstrerte at ved å ekstrahere med en SLM på 1 mm ved 2,5 V fra 1 mL prøveløsning ble 11 % av totalmengden av amitriptylin ekstrahert ut av reaksjonskammeret etter 30 min, og det ble ansett som akseptabelt for dette arbeidet (tilfredsstillelse av teoretisk forutsetning a, side 34). Oppkonsentrering før deteksjon påvirkes av ekstraksjonseffektiviteten og akseptorløsningens hastighet. Lav hastighet og kraftige ekstraksjonsbetingelser gir god deteksjonssensitivitet, men for EME-probe/MS-systemet er "myk" ekstraksjon og rask transport til MS like viktig for optimal metabolismemonitorering. Med betingelsene for "myk" ekstraksjon og en hastighet av akseptorløsningen på 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ ble amitriptylin oppkonsentrert med en faktor på 1,21. EME er betraktelig raskere enn LPME, og ekstraksjon med spenning er viktig for å oppnå rask transport gjennom SLM og troverdig måling av høye metabolske hastighetskonstanter (tilfredsstillelse av teoretisk forutsetning c, side 34).

4.5 Validering av EME-probe/MS-systemet

Før EME-probe/MS-systemet ble anvendt i in vitro metabolismestudier ble systemet evaluert med hensyn på linearitet og repeterbarhet. Dette er viktig for å undersøke dataenes troverdighet. Repeterbarhet ble undersøkt ved å utføre 5 parallelle ekstraksjoner med 3,5 μM amitriptylin. Gjennomsnittet for MS-intensiteten ved maksimalverdi for m/z 278 hadde et relativt standardavvik på 14 %. Dette bekrefter at EME-probe/MS-systemet gir akseptabel repeterbarhet. Deretter ble linearitet undersøkt ved å ekstrahere fire konsentrasjonsnivåer av amitriptylin i intervallet 0,1 μM - 2,5 μM . Resultatet er illustrert i figur 21 og bekrefter at det er en lineær sammenheng mellom MS-intensitet og legemiddelkonsentrasjon i prøveløsningen i dette konsentrasjonsintervallet med en r^2 -verdi på 0,995 ($n=2$).

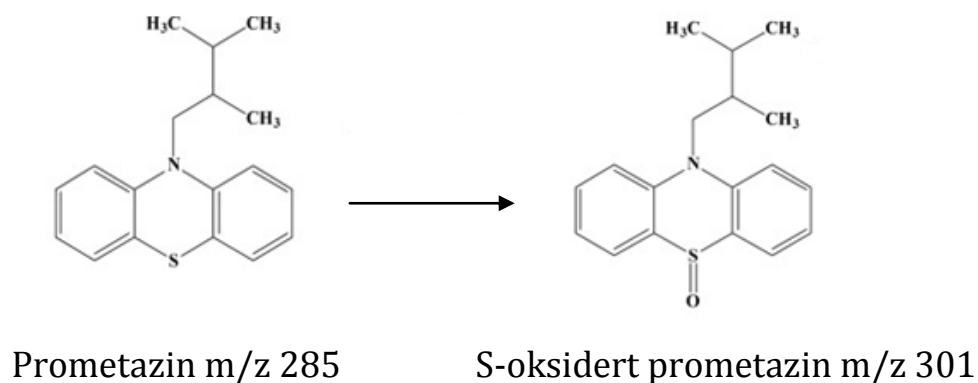
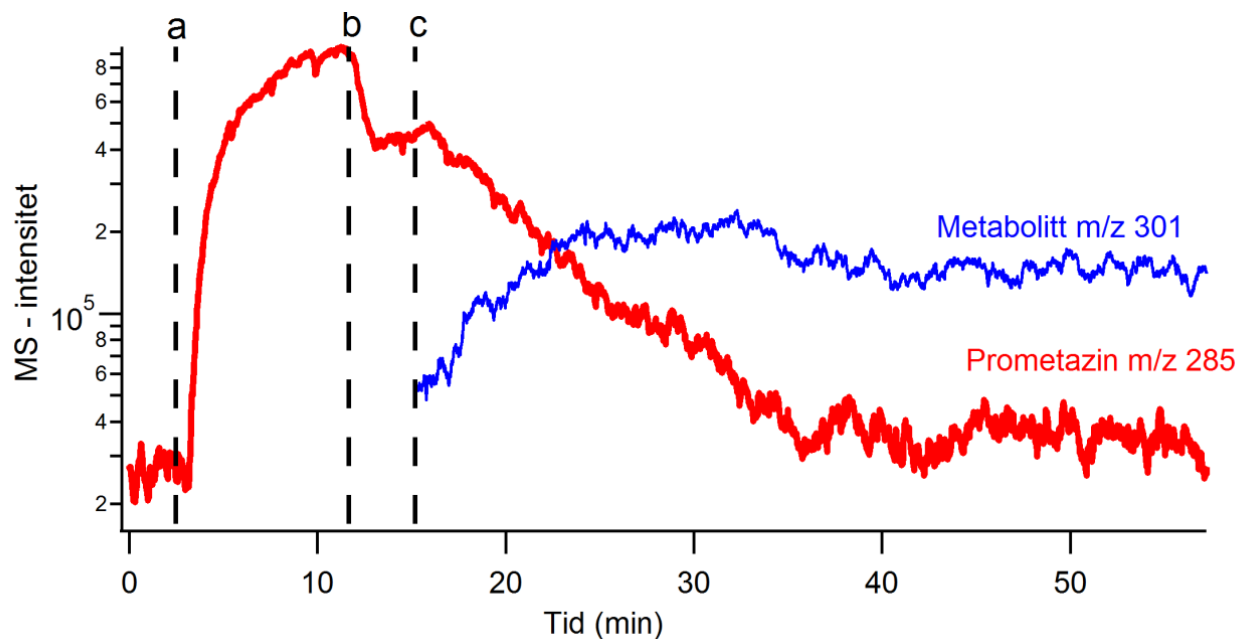


Figur 21 Linearitet for amitriptylin med EME-probe/MS-systemet i konsentrasjonsintervallet 0,1 - 2,5 µM. Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, lengde SLM: 3 mm, volum av prøveløsning: 1000 µL, hastighet akseptorløsning: 3 µL/min.

4.6 Anvendelse av EME-probe/MS-systemet i in vitro metabolismestudier

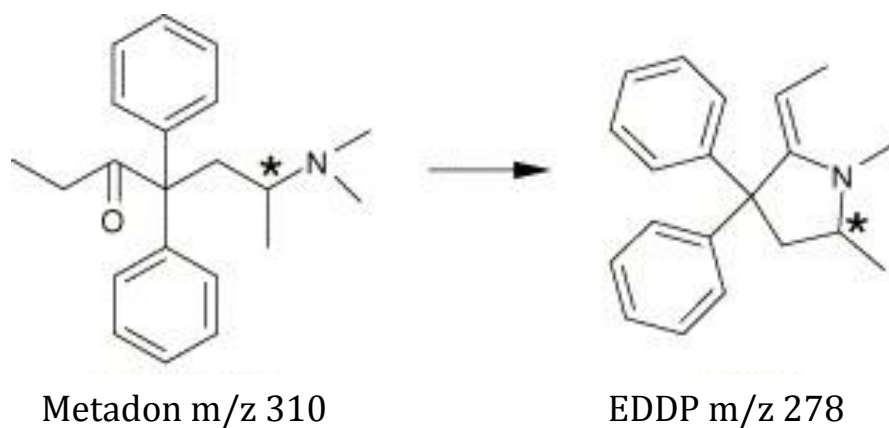
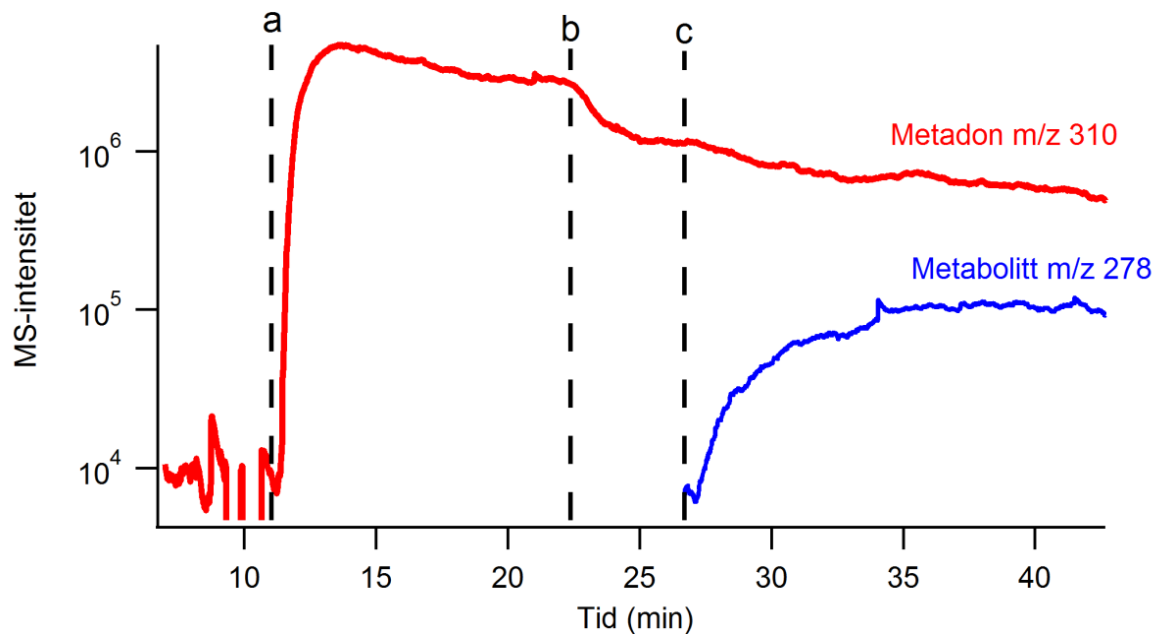
EME-probe koblet til ESI-MS ble anvendt i in vitro metabolismestudier for fem upolare, basiske legemiddelsubstanser. EME-probe/MS-systemet er primært utviklet for å kunne studere metabolisme av helt nye legemiddelsubstanser, hvor det ikke finnes forhåndsinformasjon. I dette arbeidet ble velkjente legemiddelsubstanser testet for å undersøke om resultatene med vår nye teknologi stemmer overens med allerede eksisterende data om legemidlenes metabolisme. Tidsprofilene for in vitro metabolismestudiene av prometazin, metadon, loperamid og imipramin er beskrevet i figur 22-26. Legemidlenes startkonsentrasjon var i alle eksperimentene 3,5 µM.

Prometazin ble målt ved m/z 285 og ble metabolisert med en halveringstid på 4,4 min. Metabolitten ble detektert ved m/z 301, 16 amu høyere enn molekylionet, og tilsvarer mest sannsynlig en S-oksideret metabolitt. Dette samsvarer med tidligere studier av prometazinmetabolisme [41]. Konsentrasjonen av prometazinmetabolitten økte de første 10 minuttene og nådde et maksimalnivå etter 10-20 min. Deretter ble signalet gradvis redusert til eksperimentet ble avsluttet etter 60 minutter.



Figur 22 In vitro metabolismeprofil for prometazin og antatt metabolismevei.
a) Tilsats av prometazin b) Tilsats av rottelevermikrosomer c) Tilsats av NADPH
Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, lengde SLM: 3 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

Metadon ble monitorert ved m/z 310, metabolitten ved m/z 278, og halveringstiden ble estimert til 14 min. Metabolitten er trolig etyl-dimetyl-difenyl-pyrrolinium (EDDP) og er observert i tidligere metabolismestudier av metadon [42]. Konsentrasjonen av metadonmetabolitten økte raskt de første minuttene og nådde et maksimalnivå etter 5-10 min.

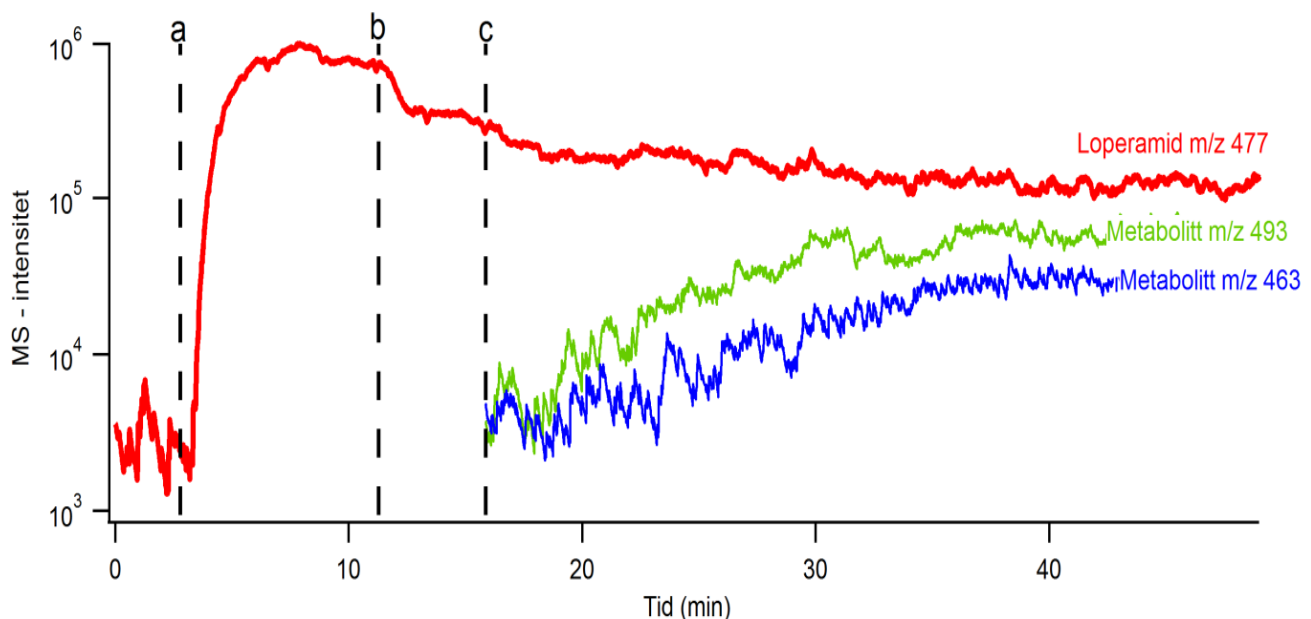


Figur 23 *In vitro* metabolismeprofil for metadon og antatt metabolismevei.

a) Tilsats av metadon b) Tilsats av rottelevermikrosomer c) Tilsats av NADPH

Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, lengde SLM: 3 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

Loperamid ble detektert ved m/z 477 og halveringstiden ble estimert til 20 min. Signaler for to metabolitter ble målt med m/z -verdi på 463 og 493, og er sannsynligvis desmetyl-loperamid (m/z 463) og hydroksey-loperamid (m/z 493) [43].



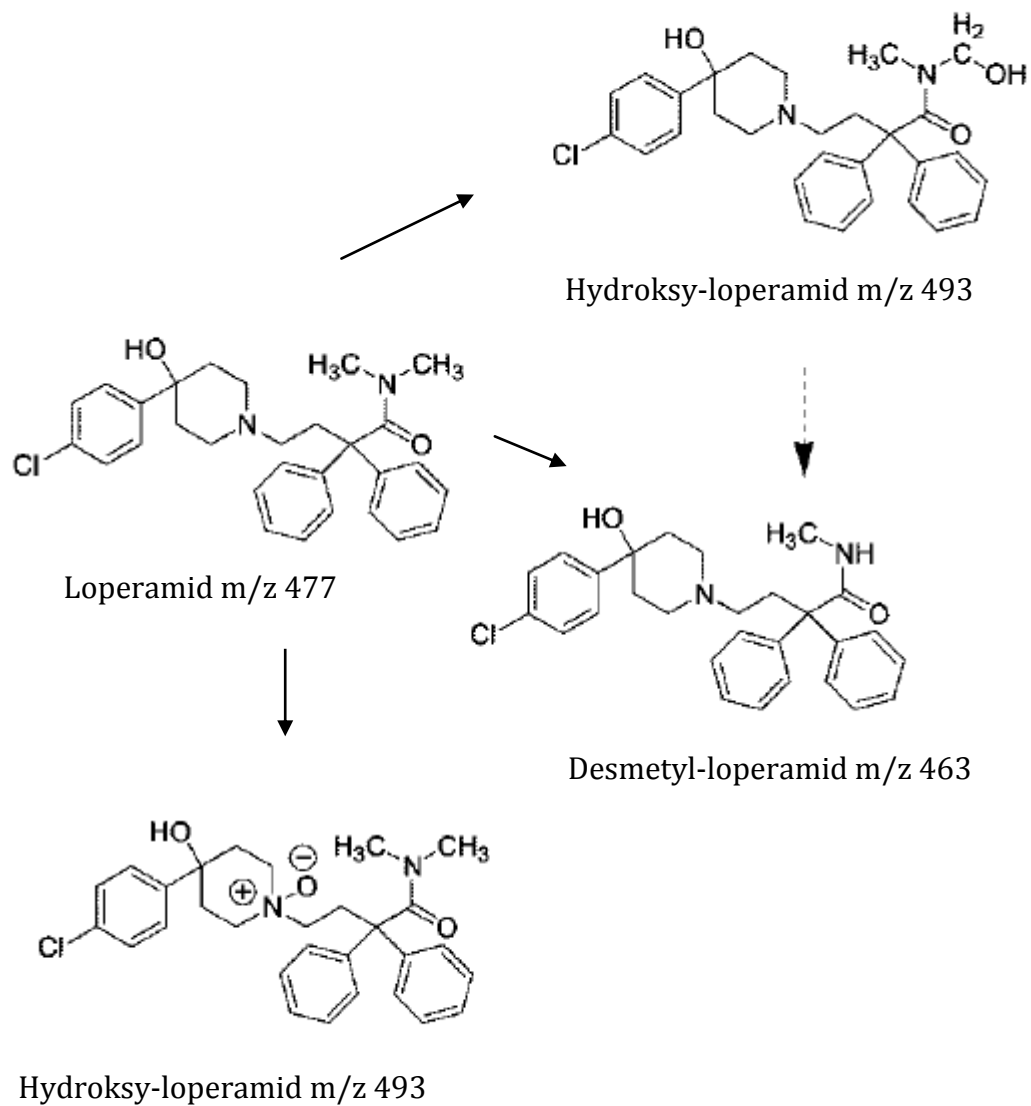
Figur 24 In vitro metabolismeprofil for loperamid.

a) Tilsats av loperamid b) Tilsats av rottelevermikrosomer c) Tilsats av NADPH

Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, lengde SLM: 3 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

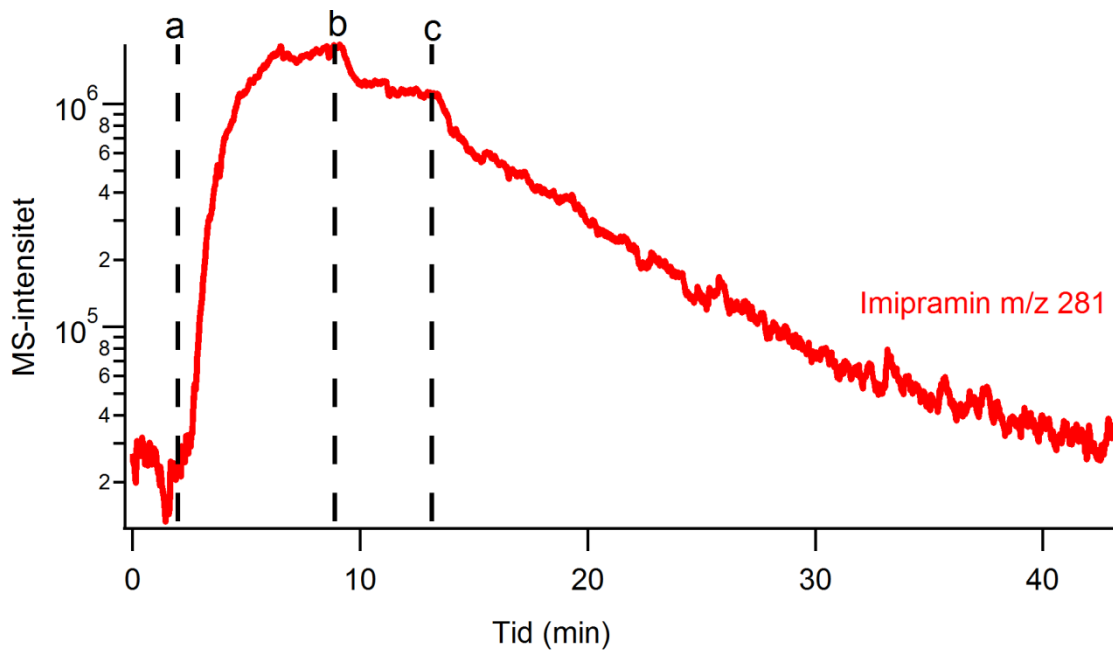
Desmetyl-loperamid (m/z 463) er hovedmetabolitten til loperamid og blir dannet ved en demetylering som tilsvarer en m/z -verdi 14 amu lavere enn det protonerte molekylionet til loperamid (m/z 477). To metabolitter er 16 amu høyere enn molekylionet og det korresponderer med m/z -verdien til monohydroksylerte metabolitter (m/z 493). En alternativ metabolismevei til desmetyl-loperamid er tap på 30 amu fra metabolitten hydroksey-loperamid, og massetapet tilsvarer eliminering av formaldehyd ($O=CH_2$).

Loperamids antatte metabolismeveier er illustrert i figur 25.



Figur 25 Antatte metabolismeveier for loperamid [43]

Imipramin ble monitorert ved m/z 281 og legemiddelets halveringstid ble estimert til 4,8 min. Imipramins metabolitter ble ikke detektert under disse ekstraksjonsbetingelsene.



Figur 26 In vitro metabolismeprofil for imipramin.

a) Tilsats av imipramin b) Tilsats av rottelevermikrosomer c) Tilsats av NADPH

Ekstraksjonsspenning: 2,5 V, lengde SLM: 3 mm, volum reaksjonsløsning: 1000 μ L, hastighet akseptorløsning: 3 μ L/min.

4.7 Veien videre for EME-probe/MS-systemet

Teknologien som ble utviklet i denne oppgaven viste god evne til å monitorere in vitro metabolisme for en rekke basiske, upolare legemiddelsubstanser. Det hjemmekonstruerte designet til proben hadde noen tekniske utfordringer, og for videre anvendelse bør et mer robust og brukevennlig system utvikles. EME-probens nåværende konfigurasjon krever "myke" ekstraksjonsbetingelser og gir derfor svært selektive ekstraksjoner. Den lave ekstraksjonsspenningen på 2,5 V diskriminerer spenningsavhengige metabolitter, og dette ble observert ved metabolisme av amitriptylin der metabolitten dihydroksy-amitriptylin (m/z 310) var detekterbar ved 15 V, men ikke ved 2,5 V. "Myke" ekstraksjonsbetingelser krever også lav

ekstraksjonseffektivitet som igjen kan gi lav oppkonsentrering, og sammenlignet med tilsvarende metabolismestudier med EME på chip var signalintensiteten med EME-probe/MS-systemet betraktelig lavere og i enkelte tilfeller kritisk nær støynivået. En videreutvikling av EME-probe/MS-systemet vil kunne være et dobbelt-flow system der både akseptorløsning og prøveløsning er i konstant bevegelse slik at frisk prøve hele tiden kommer i kontakt med SLM. På den måten vil kravet om "myk" ekstraksjon forsvinne, og med mer effektive ekstraksjonsbetingelser kan spenningsavhengige metabolitter ekstraheres og metabolitter som er tilstede i lav konsentrasjon kan detekteres. En annen årsak til systemets selektivitet er de hydrofobe egenskapene til NPOE SLM som hindrer passasje av de mer polare metabolittene. En annen retning for videreutvikling av EME-probe/MS-systemet vil være å tilpasse SLM slik at flere potensielle metabolitter kan passere væskemembranen. En tilnærming er å utvikle en hullfibermembran med flere segmenter slik at løsemidler med forskjellige egenskaper kan immobiliseres og ekstrahere metabolitter med ulike egenskaper. En annen tilnærming er å lage en kombinasjonsmembran ved å tilsette 10 % di(etylhexyl)fosfat (DEHP) og 10 % tris(etylhexyl)fosfat (TEHP) til den organiske væskemembranen for å ekstrahere hydrofile og hydrofobe baser [24]. Mindre selektive ekstraksjoner gir dårligere opprensning, og dette gir fare for passasje av uønskede matrixkomponenter.

EME-probe/MS-systemet har mange fremtidige utviklingsmuligheter for anvendelse i in vitro metabolismestudier, men teknologien kan også være aktuell innen andre anvendelsesområder. En interessant observasjon under metabolismestudiene var reduksjonen i signalintensitet ved tilsats av rottelevemikrosomer på grunn av legemiddelets proteinbinding til enzymene. Dette indikerer at teknologien kan anvendes for å måle i hvilken grad nye legemiddelstoffer binder seg til forskjellige proteiner. Teknologien kan også potensielt utnyttes til å måle legemidlers evne til å passere biologiske membraner. De upolare egenskapene til SLM kan simulere egenskapene til biologiske membraner, og vil kunne gi en midlertidig forståelse av legemidlers penetrasjonsevne.

5 Konklusjon

En enkel elektromembranekstraksjonsprobe (EME-probe) i mikroskala ble konstruert, karakterisert og koblet direkte til elektroprayonisering-massespektrometri (ESI-MS). EME-probe/MS-systemet ble anvendt i in vitro studier for monitorering av legemiddelmetabolisme i sanntid. Basiske legemiddelsubstanser ble metabolisert av rottelevermikrosomer i et reaksjonskammer, og EME-probe/MS-systemet ga direkte massespektrometrisk deteksjon av de komposisjonelle endringene i reaksjonskammeret. EME-probens rolle var å ekstrahere legemiddelet og de mest upolare metabolittene fra reaksjonskammeret og kontrollere overføringen til analyseinstrumentet. Dette var viktig for å hindre at buffersalter og proteiner fra reaksjonskammeret skulle gi ionesuppresjon og kontaminasjon av MS. Spenning og sammensetning av SLM sikret raske og selektive ekstraksjoner.

EME-probens ekstraksjonseffektivitet kunne lett kontrolleres ved å justere parameterne spenning, volum av reaksjonsløsningen og lengde på SLM. Hastigheten av akseptorløsningen kontrollerte forsinkelsen fra ekstraksjon i reaksjonskammeret til signal i MS og var avgjørende for oppkonsentrering av analytten før deteksjon. For å unngå at reaksjonskinetikken skulle bli forstyrret var det viktig at ekstraksjonsprosessen ikke påvirket totalkonsentrasjonen i reaksjonsløsningen i betydelig grad. EME-proben ble derfor operert med lav spenning (2,5 V), kort SLM (1 mm) og volum av reaksjonsløsningen på 1 mL slik at kun en liten mengde legemiddel ble ekstrahert per tidsenhet. Disse "myke" ekstraksjonsbetingelsene kombinert med EME-probens raske ekstraksjonsprosess var viktig for å kunne måle troverdige kinetikdata. Den raske ekstraksjonsprosessen var også viktig for å oppnå hurtig MS-respons på komposisjonelle endringer i reaksjonskammeret.

Dette arbeidet har demonstrert at EME-probe/MS-systemet kan anvendes i in vitro metabolismestudier. Direkte kobling mellom reaksjonskammeret og analyseinstrumentet gir mulighet for å følge metabolismereaksjonen i sanntid og kan gi en mer detaljert forståelse for legemiddelmetabolismen spesielt med hensyn på metabolitter med kort levetid og intermediære metabolske produkter. Teknologien kan på en rask, billig og enkel måte innhente store mengder farmakokinetisk informasjon,

men metoden må valideres og sammenlignes med aksepterte standardmetoder før den kan implementeres i reelle metabolismestudier. I fremtiden kan det også bli aktuelt å utnytte teknologiens potensial innen andre anvendelsesområder, som for eksempel studier av legemidlers proteinbinding og substansers passasje over biologiske membraner.

Litteraturliste

1. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
2. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of chromatography. A, 2008. **1184**(1-2): p. 132.
3. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions*. Analyst, 2002. **127**(5): p. 608-613.
4. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.
5. Eibak, L.E.E., et al., *Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions—Fast isolation of drugs from untreated human plasma*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(31): p. 5050-5056.
6. Eibak, L.E.E., et al., *Exhaustive electromembrane extraction of some basic drugs from human plasma followed by liquid chromatography–mass spectrometry*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012. **57**: p. 33-38.
7. Eskandari, M., et al., *Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2011. **54**(5): p. 1173-1179.
8. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1): p. 220-225.
9. Middelthon-Bruer, T.M., et al., *Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs*. Journal of separation science, 2008. **31**(4): p. 753-759.
10. Balchen, M., L. Reubsæet, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction of peptides*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(2): p. 143-149.
11. Strieglerová, L., P. Kubáň, and P. Boček, *Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(37): p. 6248-6255.
12. Rezazadeh, M., Y. Yamini, and S. Seidi, *Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmefene from untreated biological fluids*. Journal of Chromatography B, 2011. **879**(15): p. 1143-1148.
13. Seidi, S., et al., *Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis*. Analytica chimica acta, 2011. **701**(2): p. 181-188.
14. Kiplagat, I.K., et al., *Trace determination of perchlorate using electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Electrophoresis, 2011.
15. Petersen, N.J., et al., *On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry*. Analyst, 2012.
16. Petersen, N.J., et al., *On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection*. Analytical chemistry, 2010. **83**(1): p. 44-51.

17. Petersen, N.J., et al., *Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(9): p. 1496-1502.
18. Petersen, N.J., et al., *On-chip electro membrane extraction*. Microfluidics and nanofluidics, 2010. **9**(4): p. 881-888.
19. Park, B.K., et al., *Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development*. Nature Reviews Drug Discovery, 2011. **10**(4): p. 292-306.
20. Gjelstad, A. and S. Pedersen-Bjergaard, *Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation*. Bioanalysis, 2011. **3**(7): p. 787-797.
21. Kjelsen, I.J.Ø., et al., *Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples*. Journal of Chromatography A, 2008. **1180**(1): p. 1-9.
22. Basheer, C., S.H. Tan, and H.K. Lee, *Extraction of lead ions by electromembrane isolation*. Journal of Chromatography A, 2008. **1213**(1): p. 14-18.
23. Payán, M.R., et al., *Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples*. Talanta, 2011. **85**(1): p. 394-399.
24. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1): p. 29-34.
25. Domínguez, N.C., et al., *Selective electromembrane extraction at low voltages based on analyte polarity and charge*. Journal of Chromatography A, 2012.
26. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst–Planck equation*. Journal of Chromatography A, 2007. **1174**(1): p. 104-111.
27. Seip, K.F., et al., *Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis?* Electrophoresis, 2013.
28. Kostianen, R., et al., *Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies*. Journal of Mass Spectrometry, 2003. **38**(4): p. 357-372.
29. Youdim, K.A. and K.C. Saunders, *A review of LC–MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**(17): p. 1326-1336.
30. Fasinu, P., P. J Bouic, and B. Rosenkranz, *Liver-based in vitro technologies for drug biotransformation studies-a review*. Current drug metabolism, 2012. **13**(2): p. 215-224.
31. Eddershaw, P.J. and M. Dickins, *Advances in *in vitro* drug metabolism screening*. Pharmaceutical science & technology today, 1999. **2**(1): p. 13-19.
32. Ekins, S., et al., *Present and future in vitro approaches for drug metabolism*. Journal of pharmacological and toxicological methods, 2000. **44**(1): p. 313-324.
33. Korfmacher, W.A., *Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery*. Drug Discovery Today, 2005. **10**(20): p. 1357-1367.
34. Tolonen, A., M. Turpeinen, and O. Pelkonen, *Liquid chromatography–mass spectrometry in *in vitro* drug metabolite screening*. Drug discovery today, 2009. **14**(3): p. 120-133.
35. Castro-Perez, J.M., *Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies*. Drug discovery today, 2007. **12**(5-6): p. 249.
36. Korfmacher, W., *Bioanalytical Assays in a Drug Discovery Environment*. Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies. 2005: CRC Press.

37. Dahlin, A. 2008 [cited 2013 09.04]; Available from: <http://www.adorgraphics.com/galleri.html>.
38. Axon, C. [cited 2013 09.04]; Available from: <http://www.chemicalize.org/>.
39. Gjelstad, A., et al., *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**(1): p. 38-45.
40. Gjelstad, A., et al., *Kinetic Aspects of Hollow Fiber Liquid-phase Microextraction and Electromembrane Extraction*. Analytica Chimica Acta, 2011.
41. Huang, M., et al., *An HPLC–ESI-MS method for simultaneous determination of fourteen metabolites of promethazine and caffeine and its application to pharmacokinetic study of the combination therapy against motion sickness*. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 2012. **62**: p. 119-128.
42. Wilkins, D.G., et al., *Quantitative analysis of methadone and two major metabolites in hair by positive chemical ionization ion trap mass spectrometry*. Journal of analytical toxicology, 1996. **20**(6): p. 355-361.
43. Kalgutkar, A.S. and H.T. Nguyen, *Identification of an N-methyl-4-phenylpyridinium-like metabolite of the antidiarrheal agent loperamide in human liver microsomes: underlying reason (s) for the lack of neurotoxicity despite the bioactivation event*. Drug metabolism and disposition, 2004. **32**(9): p. 943-952.