

MASTEROPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Dried blood spots på oppløselige polymere i kombinasjon med ulike prøveopparbeidelsesmetoder

Kristine Kogstad



Faggruppen for Legemiddelanalyse
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Dried blood spots på oppløselige polymere i kombinasjon med ulike prøveopparbeidelsesmetoder

Kristine Kogstad

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for Legemiddelanalyse,
avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt,
Universitetet i Oslo i perioden februar 2013 til mai 2014

Veiledere:
Førsteamanuensis Astrid Gjelstad
Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Stipendiat Lars Erik Eng Eibak

© Kristine Kogstad

2014

Dried blood spots på oppløselige polymere i kombinasjon med ulike
prøveopparbeidelsesmetoder

Kristine Kogstad

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

I dette arbeidet er bruk av *dried blood spots* (DBS) på den oppløselige polymeren karboksymetylcellulose (CMC) undersøkt. Hensikten har vært å se om oppløselige polymere som materiale for DBS kan kombineres med de konvensjonelle prøveopparbeidelsesmetodene fast-fase ekstraksjon (SPE) og felling, samt den nye ekstraksjonsmetoden *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME). Bruk av DBS forenkler blodprøvetaking og reduserer blodprøvevolumet sammenlignet med tradisjonelle metoder for blodprøvetaking. I tillegg er lagring og transport av prøvene enkelt. Ved å bruke CMC som materiale for å avsette blodprøvene, kan prøvene løses fullstendig opp før prøveopparbeidelsen.

Modellanalyttene; amitriptylin, fluoxetin, haloperidol og quetiapin, ble tilsatt til blankt fullblod og avsatt på CMC i dråper på 5 µl før de ble tørket, stanset ut og oppløst. Deretter ble de oppløste prøvene opparbeidet med en av de tre prøveopparbeidelsesmetodene og analysert på HPLC eller LC-MS. Bruk av felling med acetonitril ga utbytte i området 87-97 % for de fire modellanalyttene. For PALME lå utbyttene på 49-90 %. SPE viste seg i midlertid vanskelig å kombinere med DBS fordi blodkomponenter tettet kolonnen og ga et forurenset eluat.

Metoden for felling ble evaluert for modellanalytten quetiapin ved bruk av LC-MS. Resultatene viste linearitet i konsentrasjonsområdet 10-1000 ng/ml med $r^2 > 0,99$, og det relative standardavviket (RSD) var < 15 %. Deteksjonsgrensen (LOD) for quetiapin ble målt til 0,8 ng/ml og kvantifiseringsgrensen (LOQ) 2,8 ng/ml.

Målinger av CMC i ekstraktene fra SPE og felling viste at > 99 % av polymeren blir fjernet fra prøven ved bruk av felling med acetonitril. For SPE forsvinner det meste av polymeren ut med den påsatte prøven eller vaskeløsningene og kun rundt 1 % finnes igjen i ekstraktet. Målinger av CMC ble ikke gjennomført for PALME.

Dette arbeidet har vist at DBS på oppløselige polymere kan kombineres med felling og PALME, men foreløpige resultater tyder på at kombinasjonen med SPE er vanskelig.

Forord

En stor takk til Stig, Astrid og Lars-Erik for veldig god veiledning, oppfølging og hjelp gjennom hele masteroppgaven. Takk for at dere er så imøtekommende, og for at dere har vist meg hvor spennende forskning er. Dette året hadde ikke blitt det samme uten dere!

Takk til Berit Smestad Paulsen for hjelp med målinger av CMC.

Takk til de andre masterstudentene på avdelingen for faglige (og mindre faglige) samtaler, og til alle på avdeling for legemiddelanalyse for et veldig godt arbeidsmiljø, og for råd, tips og hjelp på laben.

Takk til familien min for hjelp og støtte gjennom hele studietiden, og for at dere alltid stiller opp.

Og sist, men ikke minst, til Glenn: Tusen takk for oppmuntring, tålmodighet og for at du alltid er der for meg. Du er best!

Oslo, mai 2014

Kristine Kogstad

Forkortelser

µg	Mikrogram
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization (atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon)
CID	Collision-induced dissociation
CMC	Carboxymethylcellulose (karboksymetylcellulose)
DBS	Dried blood spots (tørkede bloddråper)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (etylendiamintetraeddiksyre)
EMA	European Medicines Agency
EME	Electromembrane extraction (elektromembranekstraksjon)
ESI	Electro spray ionization (elektrosprayionisasjon)
HF-LPME	Hollow-fiber liquid-phase microextraction (hulfiber væskefase mikroekstraksjon)
HIV	Human immunodeficiency virus
HPLC	High performance liquid chromatography (væskekromatografi)
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry (væskekromatografi-massespektrometri)
LLE	Liquid-liquid extraction (væske-væske ekstraksjon)
LOD	Limit of detection (deteksjonsgrense)
LOQ	Limit of quantification (kvantifiseringsgrense)
mg	Milligram
ml	Milliliter
MS	Massespektrometri/massespektrometer
NaOH	Natriumhydroksid
ng	Nanogram

Forkortelser

PALME	Parallel artificial liquid membrane extraction
pg	Pikogram
PVDF	Polyvinylidene fluoride (polyvinylidenfluorid)
RF	Radiofrekvens
rpm	Revolutions per minute (omdreininger per minutt)
RSD	Relative standard deviation (relativt standardavvik)
S/N	Signal-to-noise ratio (signal-til-støy-forhold)
SPE	Solid phase extraction (fast-fase ekstraksjon)
SRM	Selective reaction monitoring (selektiv reaksjonsmonitorering)
SSRI	Selectiv serotonin reuptake inhibitors (selektiv serotoninreopptakshemmere)
TCA	Tricyclic antidepressants (trisykliske antidepressiva)
TDM	Therapeutic drug monitoring (terapeutisk legemiddelmonitorering)
UV	Ultraviolet (ultrafiolett)
V	Volt
Vis-absorbans	Visible absorbance (absorbans av synlig lys)
Å	Ångstrøm

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
1.1	Bakgrunn	1
1.2	Hensikt.....	3
2	Teori	4
2.1	<i>Dried blood spots</i>	4
2.1.1	Karboksymetylcellulose	5
2.2	Fast-fase ekstraksjon.....	6
2.2.1	Mixed mode kationbytter	7
2.3	Felling.....	7
2.4	<i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>	8
2.5	HPLC-UV og LC-MS.....	9
2.6	Modellanalyttene	13
2.6.1	Amitriptylin.....	14
2.6.2	Fluoxetin.....	14
2.6.3	Haloperidol.....	14
2.6.4	Quetiapin	14
3	Eksperimentelt.....	15
3.1	Modellanalytter og kjemikalier	15
3.2	Blod	16
3.3	Løsninger.....	16
3.3.1	Stamløsninger.....	16
3.3.2	Standardløsninger.....	17
3.3.3	Løsninger.....	17
3.3.4	Prøveløsninger.....	19
3.3.5	Mobilfaser til HPLC-UV og LC-MS	19
3.4	Materiale for <i>dried blood spots</i>	20
3.5	Prøveopparbeidelse.....	20
3.5.1	Fast-fase ekstraksjon	21
3.5.2	Felling.....	22
3.5.3	<i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>	22
3.6	Måling av CMC	23

3.7	HPLC-UV	24
3.8	LC-MS	25
3.9	Evaluering.....	26
3.9.1	Linearitet	26
3.9.2	Repeterbarhet	27
3.9.3	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	27
3.10	Beregninger	27
3.10.1	Utbytte	27
3.10.2	Relativt standardavvik.....	27
3.10.3	Oppkonsentrering	28
3.10.4	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	28
3.10.5	T-test.....	29
4	Resultater og diskusjon	30
4.1	Innledende forsøk	30
4.1.1	Retensjonsrekkefølge	30
4.2	Materiale og oppløsningsmedium for <i>dried blood spots</i>	31
4.2.1	Oppløsning av <i>dried blood spots</i> før fast-fase ekstraksjon og felling.....	31
4.2.2	Oppløsning av <i>dried blood spots</i> før <i>parallel artificial liquid membrane extraction</i>	32
4.3	<i>Dried blood spots</i> kombinert med fast-fase ekstraksjon	33
4.3.1	Polymerens påvirkning.....	34
4.3.2	Blodets påvirkning	35
4.3.3	Måling av CMC.....	36
4.4	<i>Dried blood spots</i> kombinert med felling.....	37
4.4.1	Fellingsreagens.....	37
4.4.2	Volum av fellingsreagens.....	39
4.4.3	Utbytte og RSD	39
4.4.4	Felling av oppløste <i>dried blood spots</i> uten modellanalytter	40
4.5	<i>Dried blood spots</i> kombinert med <i>parallel artificial liquid membrane extraction</i> ...	41
4.5.1	Ekstraksjonstid	42
4.5.2	Ekstraksjonsutbytte og RSD.....	43
4.5.3	Ekstraksjon av oppløst CMC og <i>dried blood spots</i> uten modellanalytter.....	43
4.5.4	Måling av CMC.....	45

4.6	Evaluering.....	45
4.6.1	Linearitet	46
4.6.2	Repeterbarhet	47
4.6.3	Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense	48
4.7	Veien videre.....	48
5	Konklusjon	50
	Litteraturliste	51

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Interessen for *dried blood spots* (DBS) har økt de siste årene. Denne teknikken innebærer innsamling av små blodprøvevolum (10-25 μ l) som avsettes på filterpapir for lagring og transport. Når prøvene skal analyseres, stanses hele eller deler av flekken ut og ekstraheres med et løsemiddel før ekstraktet analyseres, f.eks. på et LC-instrument [1].

Bruken av DBS går tilbake til tidlig på 1960-tallet, da Guthrie brukte teknikken til å måle fenylyalanin i nyfødte for å påvise fenylketonuri [2]. Dette har bidratt til at DBS i dag inngår i screening av nyfødte for å påvise arvelige stoffskiftesykdommer. Ut over dette var interessen rundt DBS lav i mange år, men mot slutten av 2000-tallet begynte interessen igjen å ta seg opp på grunn av sensitive analyseinstrumenter. I dag brukes DBS også innenfor terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM), farmakokinetiske, farmakodynamiske og toksikokinetiske studier [1, 3]. Hovedsakelig omfatter teknikken analyse av små molekyler som legemidler eller rusmidler, men de senere årene er den også beskrevet for større molekyler som proteiner og antistoffer [1].

DBS er et alternativ til dagens mest brukte metoder for prøvetaking, der man vanligvis tapper flere milliliter biologisk væske. Dagens metoder krever ikke bare et større væskevolum, men det er også krav til transport og lagring av prøvene fordi de må holdes nedfrost. DBS har flere fordeler; fordi det ikke er nødvendig at prøvene fryses ned, blir transport og lagring enklere. Personer som håndterer prøvene blir også i mindre grad eksponert for smittsomme sykdommer [3, 4]. Dette skyldes at virus som finnes i serum eller plasma, som HIV-1 og -2, og hepatitt C virus, mister sin evne til å infisere andre celler ved tørking [5]. Bruk av DBS innebærer enkel prøvetaking, som kun består i et lite stikk i fingeren eller hælen, og som pasienten i mange tilfeller kan gjennomføre selv dersom det er ønskelig. Man trenger i tillegg et lite prøvevolum (<100 μ l) sammenlignet med vanlig blodprøvetaking, der man trenger fra 0,5 til 30 ml blod [3, 4]. Dette har spesielt stor betydning for nyfødte og premature som har lite blodvolum. I følge European Medicines Agency (EMA) er det anbefalt at blodprøvevolumet ikke overstiger 3 % av det totale blodvolumet over en periode på fire uker, eller 1 % per blodprøve. Nyfødte har et blodvolum på 80-90 ml/kg kroppsvekt. 3 % tilsvarer dermed et blodprøvevolum på 2,4-2,7 ml/kg kroppsvekt [6]. For premature er blodvolumet

spesielt lite. Disse barna har i tillegg ofte behov for flere ulike analyser av blodet som kan gjøre det vanskelig å få et stort nok blodprøvevolum uten at det går ut over barnet. Dette volumet kan reduseres betydelig ved bruk av DBS. Et annet område der man kan ha stor nytte av de små prøvevolumene er i dyrestudier. Avhengig av dyrets størrelse vil en blodprøve på 1 ml kunne føre til at dyret dør [4]. Bruk av DBS vil i dette tilfellet kunne redusere antall forsøksdyr fordi prøvevolumene er så små at dyrene overlever. Dette vil også redusere kostnadene i forbindelse med slike forsøk [1, 4].

Filterpapirene som blodprøvene avsettes på er i dag hovedsakelig cellulosebaserte, men det finnes også andre materialer [4, 7]. Materialene kan impregneres for å bedre ekstraksjonen, og dermed øke ekstraksjonsutbyttene og redusere variabiliteten [7]. Funksjonen til filterpapiret er å absorbere blodet som avsettes og på denne måten kunne brukes til å lagre blodprøvene [4]. Egenskaper som porestørrelse og tykkelse av materialene har betydning for kapasiteten til filterpapiret samt hvordan blodet sprer seg på papiret. Hvordan blodet sprer seg påvirkes også av blodets hematokrit, som har en effekt på blodets viskositet [7]. Ulik hematokrit mellom individer er en utfordring dersom kun deler av den tørkede bloddråpen stanses ut. Når bloddråpen ikke spres likt på filterpapiret på grunn av varierende hematokrit, vil blodvolumet i de utstansede flekkene variere, noe som kan påvirke kvantitative målinger [8].

Ekstraksjonstrinnet i prøveopparbeidelsen av DBS er et av de viktigste trinnene før en kvantitativ analyse. Hvor effektiv ekstraksjonen er, kan ha en stor betydning for ekstraksjonsutbyttene og dermed også for sensitiviteten. Metodens nøyaktighet og presisjon kan også påvirkes. I dag brukes ofte et organisk løsemiddel eller en blanding av et organisk løsemiddel og vann til ekstraksjon av DBS. Ekstraksjonen kan også kombineres med for eksempel fast-fase ekstraksjon (SPE) eller inndamping og reløsning for å bedre opprensningen av prøven. Slike prosedyrer kan være veldig effektive, men tar lang tid [1].

I 2012 ble det utviklet en ny idé til materiale for DBS ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo [9]. Vannløselige polymere av alginat og kitosan ble brukt til å avsette blodprøvene på. Etter tørking ble prøvene stanset ut og oppløst i vandig løsning. Materialet med de avsatte prøvene var fullstendig oppløst i løpet av tre minutter. Deretter ble prøvene opparbeidet ved bruk av elektromembranekstraksjon (EME). Denne metoden ga høye ekstraksjonsutbytter i løpet av kort tid [9].

Prøveopparbeidelse gjøres når en prøve har en for kompleks sammensetning til at den kan analyseres direkte. Det finnes flere strategier for prøveopparbeidelse, og hensikten er å fjerne forurensninger fra prøven slik at disse ikke ødelegger analyseinstrumentene eller interfererer med bestemmelsen av analytt [10, 11]. Proteinfelling er en måte å fjerne forurensninger fra prøven ved å tilsette et reagens som gjør at proteiner feller ut og kan sentrifugeres vekk. En annen strategi er å isolere analytten fra prøven. Dette kan gjøres med f.eks. SPE eller væskevæske ekstraksjon (LLE), der analytten overføres til en fase som ikke er blandbar med prøveløsningen [11]. De senere årene har trenden innenfor prøveopparbeidelse blant annet vært miniatyrisering av metodene. Det er blitt gjort miniatyrisering av både SPE og LLE [10]. I 2013 ble en ny idé til en metode for miniatyrisert LLE i 96-brønnsformat presentert. Metoden kalles *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) og baserer seg på ekstraksjon fra en vandig prøve via en organisk væskemembran over i en vandig akseptorfase [12].

Når oppløselige polymere benyttes i DBS får man en prøveløsning som består av både oppløst polymer, blodkomponenter og analytt. Før disse kan analyseres er det derfor helt nødvendig å gjøre en opprensning av prøvene [9].

1.2 Hensikt

For å øke interessen rundt vannløselige polymere som materiale for DBS har det vært ønskelig å kombinere disse materialene med konvensjonelle prøveopparbeidelsesmetoder.

Arbeidet med bruken av oppløselige polymere er en videreutvikling av prosjekter som tidligere er gjennomført ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, der alginat og kitosan ble benyttet som materialer for DBS [9, 13]. I dette prosjektet er karboksymetylcellulose (CMC) brukt som materiale til å avsette blodprøvene på, før de har blitt tørket, stanset ut, oppløst og til slutt opparbeidet med ulike metoder, før analyse på HPLC eller LC-MS. Hensikten har vært å undersøke om bruken av oppløselige polymere som materiale for DBS kan kombineres med de allerede godt kjente metodene for prøveopparbeidelse; felling og SPE. I tillegg var det ønskelig å kombinere DBS med en ny prøveopparbeidelsesmetode; PALME, som er under utvikling ved Farmasøytisk Institutt.

2 Teori

2.1 *Dried blood spots*

Dried blood spots (DBS) er betegnelsen på bloddråper som er avsatt på filterpapir og tørket. Teknikken brukes til oppbevaring av blodprøver fra prøvetaking til analyse [4]. DBS brukes hovedsakelig i analyser av små molekyler, f.eks. legemidler, men kan også brukes på større molekyler som proteiner [1]. I dag brukes DBS i screening av nyfødte for å påvise arvelige stoffskiftesykdommer, samt innenfor terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM), farmakokinetiske, farmakodynamiske og toksikokinetiske studier [1, 3].

Når man skal benytte DBS gjøres vanligvis et lite stikk i finger eller hælen og en bloddråpe (10-25 μ l) avsettes på et DBS-kort innenfor en markert sirkel, se Figur 1. Kortene tørkes deretter i romtemperatur i 2-3 timer før man stanser ut en del av eller hele flekken [1, 3]. Kortene kan også oppbevares over lengre tid, men bør da beskyttes mot fuktighet i zip-lock poser med tørkemiddel [3]. Etter at prøvene er stanset ut ekstraheres de ved bruk av et organisk løsemiddel, som metanol eller acetonitril, eller med en blanding av vann og organisk løsemiddel. Ultralydbad kan benyttes for å bedre ekstraksjonseffektiviteten. Prøvene sentrifugeres og supernatanten kan deretter injiseres direkte i et HPLC-system, eller man kan dampe inn og reløse i et løsemiddel som er bedre egnet for analysen [1, 3]. Det er også mulig å gjøre en ytterligere opprensning av prøvene ved å bruke fast-fase ekstraksjon (SPE) eller en annen prøveopparbeidelsesmetode [1].



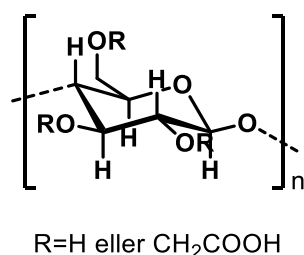
Figur 1: Foto av kommersielle DBS-kort [14]

2.1.1 Karboksymetylcellulose

Materialet som er brukt til å avsette bloddråpene på i dette prosjektet er i utgangspunktet en sårbandasje som består av natrium karboksymetylcellulose (CMC).

CMC er en polykarboksymetyleter av cellulose [15]. Cellulose består av en rekke sammenhengende β -D-glukopyranose molekyler som er bundet sammen. Lengden til disse kjedene avhenger av cellulosens opprinnelse og hvordan den er behandlet [16]. I CMC er noen av hydroksylgruppene i cellulosemolekylene erstattet med HOOC-CH_2 -grupper [15]. Strukturen til CMC er vist i Figur 2. CMC syntetiseres ved at cellulose reageres med monokloreddiksyre i nærvær av en sterk natriumhydroksidløsning. Hvor mange av hydroksylgruppene som substitueres er avhengig av konsentrasjonen av monokloreddiksyre, temperatur og reaksjonstid [17]. Cellulose i seg selv er ikke vannløselig, og løseligheten av CMC er avhengig av graden av substitusjon [16]. Substitusjonsgraden er gjennomsnittlig antall substituerte hydroksylgrupper per glukoseenhet. Med en substitusjonsgrad over 0,4 er CMC fullstendig løselig, mens den under 0,4 kan svelles, men ikke løses opp [17]. CMC er ikke toksisk og er kjemisk stabilt [16].

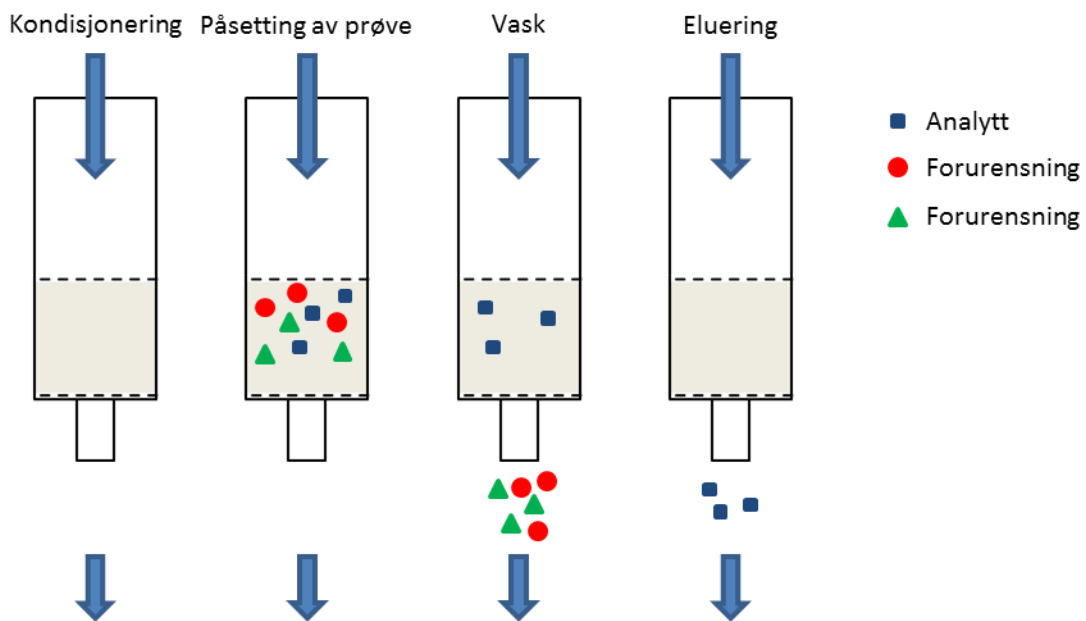
CMC har et bredt bruksområde og kan i tillegg til å brukes i sårbandasjer også benyttes som fortykningsmiddel og stabilisator i mat og kroppspoleieprodukter, som viskositetsmodifiserende- og suspensjonsmiddel i husholdnings- og industriprodukter, f.eks. vaskemiddel, og som farmasøytisk hjelpestoff [17].



Figur 2: Repeterende strukturenhet i CMC

2.2 Fast-fase ekstraksjon

Fast-fase ekstraksjon (SPE) er en prøveopparbeidelsesmetode som baserer seg på analytters evne til å fordele seg mellom overflaten av et fast stoff (sorbent) og en væske. Funksjonelle grupper på overflaten av sorbenten sørger for interaksjoner med analyttene. Sorbenten er pakket i en ekstraksjonskolonne. Under ekstraksjonen trekkes væske gjennom ekstraksjonskolonnen i flere trinn [11], se Figur 3. En generell SPE-prosedyre består av kondisjonering for å aktivere sorbenten, vask for å redusere løsemiddelstyrken, påsettelse av prøveløsning, vask for å fjerne forurensninger og eluering for å ekstrahere analytten ut av sorbenten [18]. Under påsettelse av prøveløsningen er målet at analytten skal bli fullstendig retardert. For at dette skal skje må prøveløsningen ha svak løsemiddelstyrke slik at den ikke bryter interaksjonene mellom analytten og sorbenten. Under elueringen, når analyttene ekstraheres ut av sorbenten, brukes et løsemiddel med høy løsemiddelstyrke slik at interaksjonene mellom analytt og sorbent brytes. Ved opparbeidelse av vandige prøver som plasma og urin brukes ofte omvendt-fase ekstraksjon, basert på hydrofobe interaksjoner, ionebytterekstraksjon, basert på ioniske interaksjoner, eller en kombinasjon av disse [11].



Figur 3: Trinn i fast-fase ekstraksjon

2.2.1 Mixed mode kationbytter

Mixed mode ekstraksjon er SPE der man benytter seg av både hydrofobe og ioniske interaksjoner. Denne teknikken kan brukes på analytter med ioniserbare grupper [11]. For basiske analytter brukes mixed mode kolonner med kationbytter. Fordi ioniske interaksjoner er sterkere enn hydrofobe interaksjoner har man mulighet til å vaske kolonnen med metanol, som kun bryter de hydrofobe interaksjonene. På denne måten får man vasket ut hydrofobe forurensninger samtidig som analytten blir sittende igjen på kolonnen ved hjelp av de ioniske interaksjonene [19]. Analytten elueres til slutt ut av kolonnen med et elueringsmiddel som bryter både de hydrofobe og de ioniske interaksjonene [11, 19]. Bruk av mixed mode ekstraksjon gjør at man får en god opprensning av prøven fordi man effektivt kan vaske bort hydrofobe forurensninger [10, 11].

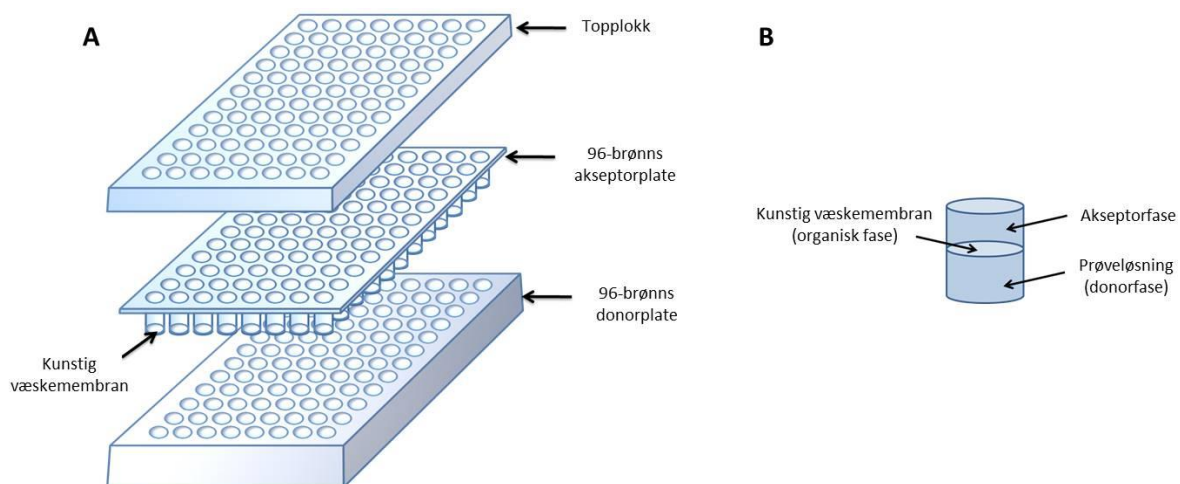
2.3 Felling

Felling (ofte kalt proteinfelling) er en prøveopparbeidelsesmetode som kan fjerne proteiner og andre materialer i en prøve før analyse. Dette gjøres for å hindre at disse stoffene feller ut og tetter analyseinstrumentet under en analyse. Felling brukes ofte til prøver av plasma eller fullblod [20]. Metoden er rask, billig og enkel å gjennomføre, men forutsetter som regel en relativt høy konsentrasjon av analytt, da gjennomføringen kan føre til en fortykning av prøven. I tillegg risikerer man at analytten feller ut sammen med proteinene slik at utbyttet blir lavt [10, 20]. Felling går ut på at man tilsetter et reagens som reduserer løseligheten av proteiner og andre materialer slik at disse feller ut og kan sentrifugeres eller filtreres vekk [10, 18]. Typiske fellingsreagenser er organiske løsemidler (metanol, acetonitril), syrer (trikloreddiksyre, perklorisyre), metallioner (sinksulfat) eller salter [10, 20]. Teorien bak felling baserer seg på interaksjoner mellom fellingsreagenset og deler av proteinet. Løselige proteiner består ofte av en hydrofob kjerne, omgitt av en hydrofil overflate. Salter feller ut proteinene ved å nøytralisere proteinenes overflateladning og redusere hydratiseringen. Syrer og baser vil endre ioniseringen av proteinene. De organiske løsemidlene som brukes som fellingsreagenser er blandbare med vann og har polare grupper som interagerer med polare grupper på proteinene i konkurranse med vannet. I tillegg har løsemidlene hydrofobe grupper som interfererer med proteinenes intramolekulære hydrofobe interaksjoner, slik at det dannes

nye interaksjoner på bekostning av den stabile proteinstrukturen. Organiske løsemidler vil også redusere hydratiseringen av proteinene. Disse faktorene bidrar sammen til at proteinenes løselighet reduseres og fører til at de feller ut [18, 21]. Fordi det skjer en fortykning under gjennomføringen av felling risikerer man en metode med relativt lav sensitivitet [20]. Dersom man bruker LC-MS er dette i midlertid sjelden et problem, fordi instrumentet har så høy sensitivitet.

2.4 *Parallel artificial liquid membrane extraction*

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) er en metode for væske-væske-væske mikroekstraksjon i 96-brønnsformat. Metoden går ut på at analytter ekstraheres fra en vandig prøveløsning (donorfase) gjennom en organisk fase i form av en kunstig væskemembran og over i en vandig akseptorfase. Akseptorfase kan injiseres direkte i HPLC eller LC-MS [12]. Oppsettet for metoden vises i Figur 4. De vandige donor- og akseptorfasene er separert av en kunstig væskemembran som består av en flat membran impregnert med et organisk løsemiddel [12]. Løsemiddelet er ikke blandbart med vann og vil derfor fungere som en barriere mellom donor- og akseptorfase. Teknikken baserer seg på prinsipper tidligere kjent fra hulfiber væskefase mikroekstraksjon (HF-LPME) [22], men i stedet for hulfibre brukes flate membraner i en 96-brønnsplate for å danne den kunstige væskemembranen [12]. For basiske analytter gjøres donorfase basisk. Dette gjør at analyttene deioniseres og reduserer løseligheten i denne fasen slik at analyttene lettere ekstraheres over i den organiske fasen. Samtidig gjøres akseptorfase sur slik at analyttene ekstraheres fra den organiske fasen og over i akseptorfase på grunn av ionisering. Dette hindrer tilbakeekstrahering til den organiske fasen. Ved at volumet av akseptorfase er lite får man en god oppkonsentrering av analyttene. I tillegg gir metoden en god opprensning av prøven da store molekyler, sure komponenter og nøytrale komponenter ikke ekstraheres over i akseptorfase [22].



Figur 4: A) Oppsett for PALME [12]. B) Skjematisk framstilling av én ekstraksjonsbrønn

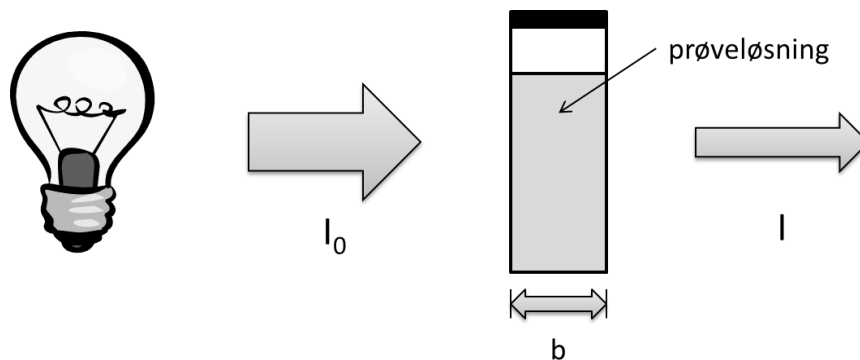
2.5 HPLC-UV og LC-MS

Væskekromatografi (HPLC) er en metode for å separere analytter fra hverandre. Teknikken baserer seg på at væske (mobilfase) presses gjennom en kolonne med et materiale (stasjonærfase) som retarderer analyttene. Ulike analytter kan retarderes ulikt og dermed transporteres gjennom kolonnen med forskjellig hastighet. Dette gjør at analyttene separeres og kommer ut av kolonnen på forskjellig tidspunkt. Det viktigste separasjonsprinsippet i HPLC er omvendt-fase-kromatografi, der stasjonærfasen er hydrofob og mobilfasen er vandig. Analyttene retarderes ved hydrofobe interaksjoner. Mobilfasen er en blanding av vann og organiske løsemidler. Styrken på mobilfasen er avhengig av mengden organisk løsemiddel. Mer løsemiddel øker styrken og sørger for at retensjonen av analytter på stasjonærfasen avtar. Når analyttene kommer ut av kolonnen påvises de av en detektor. Responsen i detektoren skal være proporsjonal med konsentrasjonen eller massen av analytt. På denne måten kan man gjøre kvantitative analyser [11]. Her omtales UV-detektoren og massespektrometeret (MS), da disse har blitt brukt i dette arbeidet.

UV-detektoren er basert på måling av absorbert stråling og følger Beers lov:

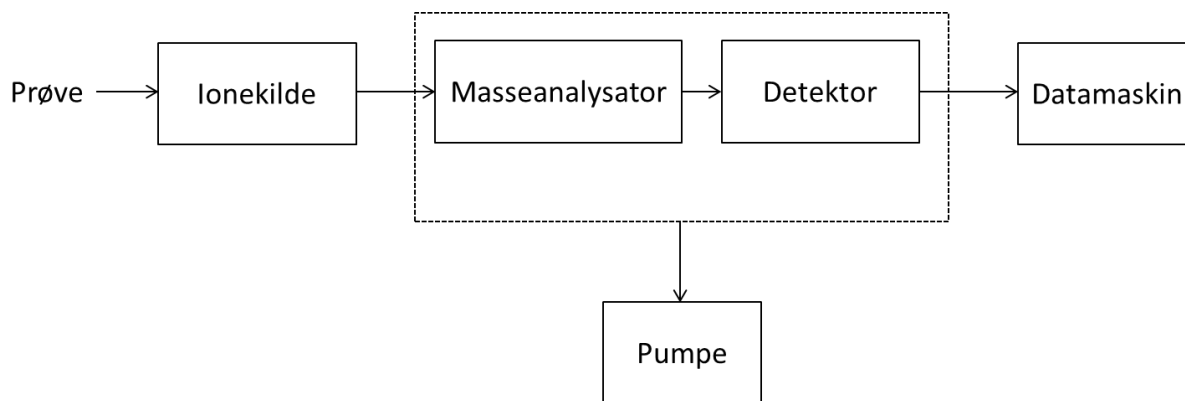
$$A = \log(I_0/I) = a \cdot b \cdot c$$

som sier at absorbansen (A) er proporsjonal med absorptiviteten til analytten (a), strålingsveien (b) og analyttkonsentrasjonen i mobilfasen (c). I UV-detektoren går mobilfasen gjennom en flow-celle som bestråles med monokromatisk elektromagnetisk stråling (med en bestemt bølgelengde) med intensiteten I_0 . Intensiteten til strålingen som passerer flow-cellen (I) blir detektert av en lysmåler, se Figur 5. UV-detektoren kan brukes på analytter som absorberer UV-stråling, og har en nedre deteksjonsgrense på 1-100 ng [11].



Figur 5: Absorpsjon av stråling

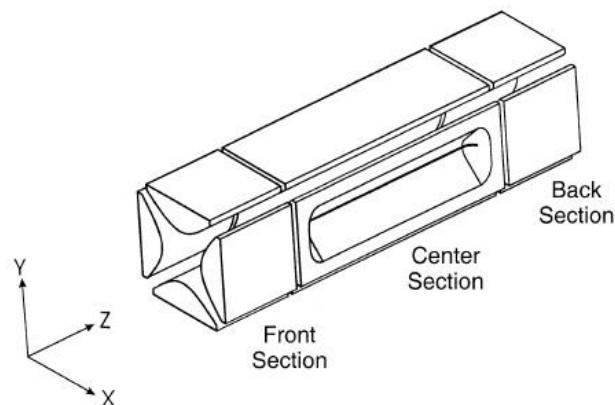
Massespektrometeret (MS) har mye lavere deteksjonsgrense enn UV-detektoren, med en nedre deteksjonsgrense på 1-100 pg, og kan brukes til å detektere legemidler i biologiske materialer. En MS består i hovedsak av ionekilde, massanalytator og detektor, se Figur 6. En pumpe sørger for vakuum i masseanalytatoren og detektoren. Prøven føres først inn i ionekilden, der analyttene blir ionisert til positive eller negative ioner. Disse kan være ustabile og vil i så fall raskt spaltes til mindre fragmenter. Ionene går deretter videre inn i masseanalytatoren der de separeres etter forholdet m/z ; masse (m) over ladning (z). Til slutt detekteres ionene og resultatene behandles med en datamaskin [11].



Figur 6: Prinsippskisse for MS

De vanligste ioniseringsteknikkene i LC-MS er elektrospøyionisasjon (ESI) og atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (APCI) [11, 23, 24]. I dette prosjektet er det brukt ESI, som derfor omtales her. ESI kan brukes når analyttene er sure eller basiske, og stoffene må være ionisert i mobilfasen. pH i mobilfasen justeres derfor slik at analyttene er ladet. I tillegg må mobilfasen bestå av flyktige komponenter slik at disse fordampes lett i ionekilden og kan transporteres vekk [11]. I ESI føres væsken fra HPLC-kolonnen gjennom et tynt kapillær. Ved enden av kapillæret dannes en aerosol av små ladete dråper. Dette gjøres ved å legge på elektrisk spenning (vanligvis 3-5 kV) ved utgangen av kapillæret som danner et elektrisk potensial. I tillegg brukes nitrogen som tørkegass for at væske skal fordampe fra dråpene. Etter hvert som væske fordampes øker ladningstettheten. Dette gjør dråpene ustabile og fører til at de til slutt sprekker og danner mindre dråper. Denne prosessen fortsetter til all væsken er fordampet og det kun er de ladete ionene igjen. Disse ionene er molekylioner, som er protonerte eller deprotonerte analytter, og eventuelle fragmentioner. Disse føres videre inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning [11, 23, 24].

Det finnes ulike masseanalysatorer. I dag er de fleste basert på kvadrupolprinsippet, men ionefelle- og time-of-flight-prinsippet er også mye brukt [11]. Her omtales lineær ionefelle, som er brukt i dette arbeidet. En lineær ionefelle består av fire parallelle stenger (se Figur 7). I ionefellen fanges ionene radially i et todimensjonalt radiofrekvent (RF) felt som dannes ved å legge spenning på de fire parallelle stengene, og aksialt ved å legge stopp-potensialer på ende-elektrodene [25, 26]. Ionene stabiliseres i ionefellen (center section), og ved å forandre RF-potensialet vil ioner med bestemte masser (m/z) slippes ut fordi de ikke lenger er stabile inne i ionefellen. Ionene går deretter til detektoren der de detekteres [11, 26].



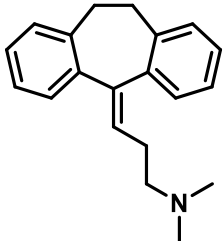
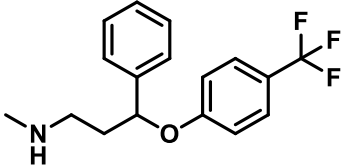
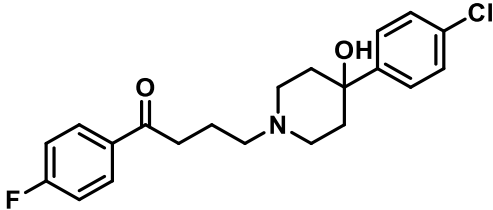
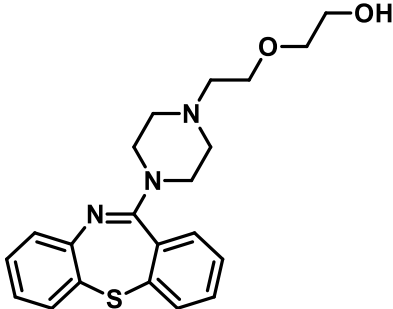
Figur 7: Skisse av en todimensjonal lineær ionefelle [26]

Det er også mulig å gjøre tandem MS i en ionefelle [26, 27]. Ved tandem MS gjøres analysen i to eller flere trinn, der man i hvert trinn kan scanne eller velge ut bestemte masser som analyseres videre i neste trinn. Mellom de ulike trinnene fragmenteres ionene, noe som gir økt sensitivitet og spesifisitet for analysen [11, 27]. Det finnes flere ulike monitoreringsprinsipper for tandem MS. I dette prosjektet er det brukt selektiv reaksjonsmonitorering (SRM). I SRM velges en masse som er karakteristisk for analytten (ofte molekylionet) i det første trinnet av analysen. Dette betyr at andre masser fjernes. Deretter fragmenteres molekylionene til produktioner og i det andre trinnet av analysen velges ett eller flere av disse produktionene, som sendes videre til detektoren. Produktionene som velges er spesifikke for analytten og dette gjør at man får en selektiv deteksjon med høy sensitivitet [11].

2.6 Modellanalyttene

I dette arbeidet er det brukt to antidepressive og to antipsykotiske legemidler som modellanalytter. Felles for disse fire er at de er basiske og hydrofobe. For oversikt over struktur, pK_a , og $\log P$, se Tabell 1.

Tabell 1: Struktur, pK_a og $\log P$ for modellanalyttene

	Struktur	pK_a [28]	$\log P$ [28]
Amitriptylin		9,76	4,81
Fluoxetin		9,80	4,17
Haloperidol		8,05	3,66
Quetiapin		7,06	2,81

[28] chemicalize.org

2.6.1 Amitriptylin

Amitriptylin er et antidepressivt legemiddel av typen trisykliske antidepressiva (TCA). Det hemmer reopptak av synaptisk frigjort serotonin og noradrenalin, og hemmer derved inaktivering av disse. Dette stimulerer funksjonene til disse monoaminene, som trolig er nedsatt ved depresjoner. TCA er ikke førstevalg ved depresjoner, men brukes ved alvorlige tilfeller. Amitriptylin kan også brukes mot kroniske smerter [29]. Terapeutisk område ligger på 0,05-0,3 µg/ml [30].

2.6.2 Fluoxetin

Fluoxetin er et antidepressivum av typen selektive serotoninreopptakshemmere (SSRI). Det har en sterkt hemmende effekt på reopptak av serotonin fra synapsespaltene. Dette øker konsentrasjonen av serotonin i synapsene. SSRI er førstevalg i behandling av depresjoner, og har generelt mindre bivirkninger enn TCA [29]. Fluoxetin har et terapeutisk område på rundt 0,16-0,5 µg/ml [30].

2.6.3 Haloperidol

Haloperidol er et førstegenerasjons lavdose antipsykotikum. Det har en sterk antidopaminerg effekt og gir ofte akutte ekstrapyramidale bivirkninger. Haloperidol har også antiemetisk effekt og kan derfor i tillegg brukes som kvalmestillende legemiddel [29]. Haloperidol har terapeutisk område på 0,005-0,017 µg/ml [30].

2.6.4 Quetiapin

Quetiapin er et annengenerasjons antipsykotikum. Det har antidopaminerg effekt og er i tillegg en potent 5-HT₂-antagonist, som gjør at det er lavere risiko for motoriske og psykiske bivirkninger. Bedre tolerabilitet og gunstigere effekt på kognitiv funksjon enn førstegenerasjons antipsykotika, gjør at annengenerasjons bør brukes når det er mulig [29]. Terapeutisk område ligger under 1 µg/ml [30].

3 Eksperimentelt

3.1 Modellanalytter og kjemikalier

Tabell 2 viser modellanalyttene og Tabell 3 viser andre kjemikalier som ble brukt i forsøkene. De tilhørende produsentene og produksjonssted er også oppgitt.

Tabell 2: Modellanalytter med tilhørende produsent og produksjonssted

Modellanalytt	Produsent (Produksjonssted)
Amitriptylin hydroklorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Fluoxetin, 20 mg kapsler	NM Pharma (Oslo, Norge)
Haloperidol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Quetiapin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

Tabell 3: Kjemikalier med tilhørende produsent og produksjonssted

Kjemikalie	Kvalitet	Produsent (Produksjonssted)
2-propanol	Gradient grade for liquid chromatography	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Acetonitril	Hypergrade for LC-MS	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Ammoniakkoppløsning	Konsentrert	Norsk Medisinaldepot (Oslo, Norge)
Dihexyl eter	97 %	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dinatriumhydrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O)	Pro analysi	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Eddiksyre	100 % For analysis	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Etanol	96 %	Arcus (Oslo, Norge)
Fenol	Ukjent	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)

Ekspérimentelt

Maursyre	98-100 % For analyse	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Maursyre	For mass spectrometry	Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland)
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$)	Pro analysi	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Natriumdihydrogenfosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Pro analysi	Merck (Darmstadt, Tyskland)
Natriumhydroksid	Analytical reagent	VWR (Leuven, Belgia)
Svovelsyre	Min 95 % Pour analyses	Prolabo (Paris, Frankrike)
Triklorediksyre	Ukjent	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Vann		Milli-Q water purification system (Molsheim, Frankrike)
Zinksulfat ($\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$)	Zur analyse	Ferak (Berlin, Tyskland)

3.2 Blod

Legemiddelfritt fullblod ble donert av en frisk frivillig ved Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. Blodet ble oppbevart i fryser ved $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. EDTA ble brukt som antikoagulant. Før bruk ble blodet tint opp og tilsatt modellanalytter til ønsket konsentrasjon.

3.3 Løsninger

3.3.1 Stamløsninger

Stamløsninger av amitriptylin og haloperidol ble laget med konsentrasjon 10 mg/ml ved å veie inn fast stoff og løse dette i etanol. For fluoxetin ble en 20 mg kapsel åpnet og innholdet

løst i etanol til en konsentrasjon på 4 mg/ml. Løsningen ble deretter filtrert med et 0,45 µm filter (Minisart RC 25 single use syringe filter, Non sterile, RC membrane, PP housing, Sartorius, Göttingen, Tyskland) for å fjerne uoppløste hjelpestoffer. Stammløsningen med quetiapin ble lånt av en laboratoriekollega. Denne var laget ved å veie inn fast stoff og løse i etanol til en konsentrasjon på 1 mg/ml. Alle stammløsningene ble oppbevart i kjøleskap, beskyttet mot lys. Vekten som ble benyttet var av typen XS205 DualRange (Mettler Toledo, Oslo, Norge).

3.3.2 Standardløsninger

Standardløsninger på 100 µg/ml ble laget ut fra de fire stammløsningene og fortynnet med 20 mM maursyre. Disse ble oppbevart i kjøleskap, beskyttet mot lys.

Standardløsninger til bruk i analysene ble laget ved å fortynne standardløsningene på 100 µg/ml i 20 mM maursyre til ønsket konsentrasjon. Disse ble oppbevart i kjøleskap og laget nye hver uke.

3.3.3 Løsninger

20 mM maursyre

377 µl konsentrert maursyre ble fortynnet med vann til 500 ml. Til analyser på HPLC-UV ble det brukt maursyre av kvaliteten 98-100 % (for analyse) og til analyser på LC-MS ble det brukt maursyre (for mass spectrometry).

Acetatbuffer (pH 5,0)

En løsning av natriumacetat ble laget ved å løse 1,2837 g natriumacetat i vann til 100 ml. Deretter ble en løsning av eddiksyre laget ved å fortynne 472 µl konsentrert eddiksyre i vann til 100 ml. 100 ml av natriumacetatløsningen ble titrert med eddiksyreløsningen til en pH på 5,0 ved hjelp av et 744 pH Meter (Metrohm, Herisau, Sveits).

Ekperimentelt

25 mM fosfatbuffer (pH 6,0)

En løsning med 25 mM Na_2HPO_4 ble laget ved å løse 0,4475 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ i 50 ml vann. En løsning med 25 mM NaH_2PO_4 ble lånt fra en laboratoriekollega. Denne ble laget ved å veie inn 1,7419 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ og løse i vann til 500 ml.

19,1 ml 25 mM Na_2HPO_4 ble tilsatt 25 mM NaH_2PO_4 til 200 ml.

pH ble målt til 6,08 ved hjelp av et 744 pH Meter (Metrohm).

2 % maursyre

Denne løsningen ble lånt fra en laboratoriekollega og var laget ved å fortynne 1 ml konsentrert maursyre i vann til 50 ml.

5 % NH_4OH i metanol

5 ml ammoniakopløsning, konsentrert, ble tilsatt 95 ml metanol.

4 % fenol

Løsningen ble lånt fra en laboratoriekollega og bestod av 4 % fenol i vann.

10 % trikloreddiksyre

2,4975 g trikloreddiksyre ble veid ut og løst i vann til 25 ml.

Metanol:0,2 M ZnSO_4 (70:30)

En løsning av 0,2 M ZnSO_4 ble laget ved å løse 1,1493 g $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ i vann til 20 ml. 15 ml av denne løsningen ble tilsatt 35 ml metanol.

10 mM NaOH

En løsning av 100 mM NaOH ble lånt av en laboratoriekollega. Denne var laget ved å veie inn 0,3999 g NaOH og løse dette i vann til 100 ml. 10 ml av denne løsningen ble fortynnet med 90 ml vann.

25 mM fosfatbuffer (pH 10,7)

Løsningen ble lånt fra en laboratoriekollega. Først ble en løsning av Na_3PO_4 laget ved å løse 3,8040 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann til 100 ml. En løsning av Na_2HPO_4 ble laget ved å løse 4,7304 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann til 500 ml. 161 ml av Na_2HPO_4 -løsningen ble tilsatt 9,8 ml av Na_3PO_4 -løsningen. Dette ble fortynnet til 200 ml med vann og pH ble målt til 10,7 ved hjelp av et 744 pH Meter (Metrohm).

3.3.4 Prøveløsninger

Prøveløsning 1

Prøvene ble laget ved å tilsette modellanalyttene fra stamløsningene på 10 mg/ml for amitriptylin og haloperidol, 4 mg/ml for fluoxetin og 1 mg/ml for quetiapin, til legemiddelfritt fullblod til en konsentrasjon på 40 µg/ml.

Prøveløsning 2

2,0 ml av en standardløsning på 5 µg/ml av hver av modellanalyttene i 20 mM maursyre, ble tilsatt CMC tilsvarende 10 biter utstanset materiale med diameter 3 mm. Denne løsningen ble fortynnet til 10,0 ml med 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) som gir en legemiddelkonsentrasjon på 1 µg/ml og en CMC-konsentrasjon tilsvarende 1 bit/ml.

Prøveløsning 3

2,0 ml av en standardløsning på 5 µg/ml av hver av modellanalyttene i 20 mM maursyre, ble fortynnet til 10,0 ml med 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0), som gir en konsentrasjon på 1 µg/ml.

Prøveløsning 4

CMC-materialet ble stanset ut i sirkler med diameter 3 mm. De utstansede bitene ble oppløst i 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) til en konsentrasjon tilsvarende 1 bit/ml.

Prøveløsning 5

CMC-materialet ble stanset ut i sirkler med diameter 3 mm. De utstansede bitene ble oppløst i 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) til en konsentrasjon tilsvarende 2 biter/ml.

Prøveløsning 6

Det ble først laget en 20 µg/ml løsning av legemidlene, ved å fortynne standardløsningen på 100 µg/ml med 20 mM maursyre. Denne ble tilsatt til fullblod til en konsentrasjon på 1000 ng/ml, som videre ble fortynnet med fullblod til ønskede konsentrasjoner.

3.3.5 Mobilfaser til HPLC-UV og LC-MS

Mobilfase A

475 ml 20 mM maursyre og 25 ml acetonitril.

Mobilfase B

25 ml 20 mM maursyre og 475 ml acetonitril.

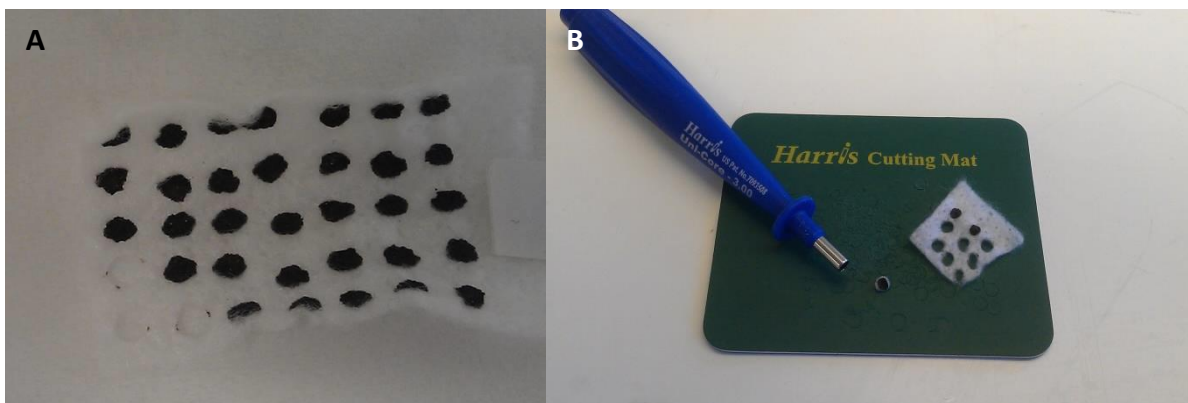
Mobilfasene ble satt på ultralydbad (Ultrasonic Cleaner, VWR, Leuven, Belgia) i 10-15 minutter før bruk, for degassing.

3.4 Materiale for *dried blood spots*

Blodprøvene ble avsatt på Aquacel Hydrofiber bandasje (ConvaTec, Deeside, Storbritannia), som består av natrium karboksymetylcellulose (CMC) [31].

3.5 Prøveopparbeidelse

Blodprøvene (prøveløsning 1 og 6) ble avsatt på CMC-materialet, 5 μ l per dråpe, se Figur 8A. Disse ble tørket i minst 2 timer og deretter stanset ut ved hjelp av en Harris Uni-Core 3.00 utstanser og Harris Cutting Mat (begge fra Agilent, Santa Clara, CA, USA), se Figur 8B.



Figur 8: A) Blodprøver avsatt på CMC. B) Utstansing av DBS

3.5.1 Fast-fase ekstraksjon

Før ekstraksjonen ble de tørkede bloddråpene oppløst i 1 ml 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) under risting på en MS 3 digital shaker (IKA, Wilmington, NC, USA) 2500 rpm.

Fast-fase ekstraksjon (SPE) ble gjennomført på en 10 mg Oasis MCX kolonne (Waters, Wexford, Irland). Væske ble trukket gjennom kolonnen ved hjelp av en manifold (Supelco analytical, Bellefonte, PA, USA) og vakuumpumpe (Nerliens Kemisk-Tekniske aktieselskap, Oslo, Norge)

Ekstraksjonsmetoden som ble benyttet tok utgangspunkt i en metode beskrevet av produsenten for kolonnen, der Oasis MCX ble benyttet på klozapin i plasma [32]. Klozapin er, i likhet med modellanalyttene som er benyttet i dette arbeidet, et basisk og hydrofobt legemiddel. pK_a for klozapin er 7,35 og log P er 3,40 [28]. Det ble gjort små forandringer i metoden for å tilpasse ekstraksjonsprosessen til prøvene som ble ekstrahert her. Metoden som ble benyttet er vist i Tabell 4. Eluatet ble dampet inn til tørrhet under en strøm av nitrogen ved bruk av en Techne Sample Concentrator med Dri-Block DB-3D (Bibby Scientific, Staffordshire, UK) og reløst i 200 μ l mobilfase A før analyse på HPLC.

Tabell 4: SPE-metode

Kondisjonering	500 μ l metanol
Vask	250 μ l vann
Ekvilibrering	500 μ l 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0)
Påsettelse av prøve	1 ml prøveløsning
Vask 1	500 μ l 2 % maursyre
Vask 2	500 μ l metanol
Eluering	2 x 150 μ l 5 % NH_4OH i metanol
Inndamping til tørrhet	Under en strøm av nitrogen
Reløsing	200 μ l mobilfase A

3.5.2 Felling

Før fellingsforsøkene ble de tørkede bloddråpene oppløst på samme måte som for SPE-forsøkene, men oppløsningsvolumet var 500 µl.

Felling ble gjennomført ved at en *dried blood spot* (DBS) oppløst i 500 µl oppløsningsmedium ble tilsatt 750 µl kald acetonitril. Dette ble sentrifugert på en Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) ved 13 000 rpm i 10 minutter. 500 µl supernatant ble dampet inn til tørrhet under nitrogen og reløst i 200 µl mobilfase A før analyse på HPLC.

3.5.3 *Parallel artificial liquid membrane extraction*

Før *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) ble gjennomført ble de tørkede bloddråpene løst opp i 500 µl 10 mM NaOH under risting på en Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) 1400 rpm ved 21 °C.

I PALME-oppsettet ble det brukt 96-brønnsplater fra Agilent (Santa Clara, CA, USA) som donorplate og en hjemmelaget «akseptorplate» med polypropylenmembran. Denne ble lånt fra en laboratoriekollega og var laget ved å forsegle en sirkel av en 100 µm tykk Accurel flat porøs polypropylenmembran (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med porestørrelse 0,1 µm, til åtte plastvialer (Thermo Scientific, Loughborough, Storbritannia) ved hjelp av en varmekilde. Etter at membranen var festet til plastvialene ble nedre delen av vialene skåret av og den øvre delen ble brukt som erstatning for akseptorplaten. For bilde av utstyret som ble brukt, se Figur 9.

PALME ble gjennomført ved at 250 µl av løsningen med oppløst DBS ble overført til brønnene i donorplaten. Polypropylenmembranen ble impregnert med 2,5 µl dihexyleter ved hjelp av en pipette for å danne den kunstige væskemembranen. 50 µl 20 mM maursyre ble overført til den hjemmelagde «akseptorplaten» som akseptorfase. Enhetene ble deretter koblet sammen og festet med teip før den ble ristet på et ristebrett (Vibramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Tyskland) på 1200 rpm i 45 minutter. Enheten ble deretter koblet fra hverandre og akseptorfase overført til vialer for direkte analyse på HPLC.



Figur 9: Utstyr til PALME. Foran: Hjemmelaget «akseptorplate». Bak: Donorplate og topplokk.

3.6 Måling av CMC

CMC ble målt med en metode beskrevet av Dubois et al [33]. I dette forsøksoppsettet ble løsninger av CMC reagert med 4 % fenol og konsentrert H_2SO_4 . Dette førte til at løsningene ble farget oransje og absorbansen av synlig lys (Vis-absorbansen) til løsningene kunne måles ved 490 nm med et spektrofotometer. Den målte absorbansen var proporsjonal med konsentrasjonen av CMC i løsningen.

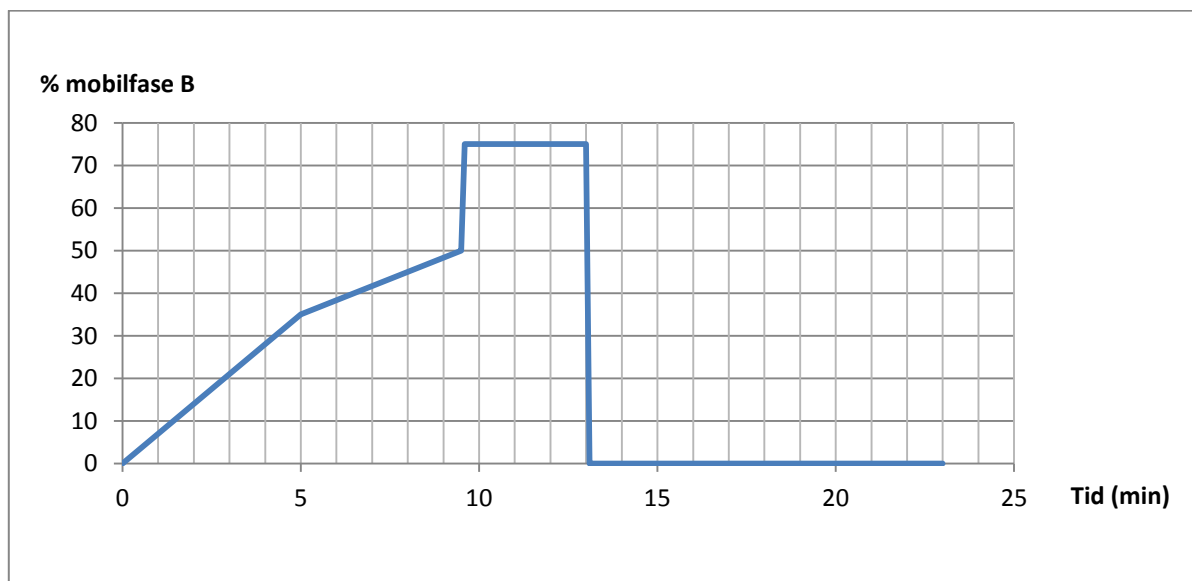
SPE ble gjennomført med en løsning av CMC med konsentrasjon tilsvarende 1 utstanset bit (3 mm i diameter) CMC per ml løsning (prøveløsning 4). Prøveløsningen både før og etter påsettelse på kolonnen, begge vaskeløsningene og eluatet fra prosedyren ble samlet opp hver for seg og 100 μ l av hver av disse løsningene ble tilsatt 1 ml 4 % fenol og 4 ml H_2SO_4 før måling av absorbansen på et DU530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA, USA).

For måling av CMC i fellingsforsøkene ble det benyttet en løsning av CMC tilsvarende 1 bit utstanset CMC (3 mm i diameter) per 0,5 ml løsning (prøveløsning 5). Metoden for felling ble gjennomført og 200 μ l supernatant ble tilsatt 400 μ l 4 % fenol og 2 ml H_2SO_4 før absorbansen ble målt. Det samme ble gjort for en løsning av CMC som ikke hadde vært gjennom prøveopparbeidelse.

3.7 HPLC-UV

HPLC med UV-deteksjon ble gjennomført på et instrument av typen Agilent 1200 som bestod av degasser (G1379B), pumpe (G1312B), autosamler (G1367C), kolonneovn (G1316B), UV-detektor (G1315C) og software av typen ChemStation for LC 3D systems, Rev. B.04.03-SP1. Alle komponentene var fra Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Til den kromatografiske separasjonen ble det benyttet en YMC-Triart C18 omvendt-fase kolonne (YMC, Kyoto, Japan). Kolonnen var 150 mm lang med en indre diameter på 2.0 mm. Partikkelstørrelsen var 5 μm og porestørrelsen 120 \AA .

Det ble benyttet gradienteluering som vist i Figur 10. Analysetiden var 23 minutter per prøve. Mobilfasehastigheten var 0,4 ml/min og injeksjonsvolumet var på 10 μl for SPE-forsøkene og 20 μl for felling og PALME. Kolonnetemperaturen ble holdt konstant under hele analysen ved 23 °C. UV-detektoren målte absorbansen ved 214 nm.



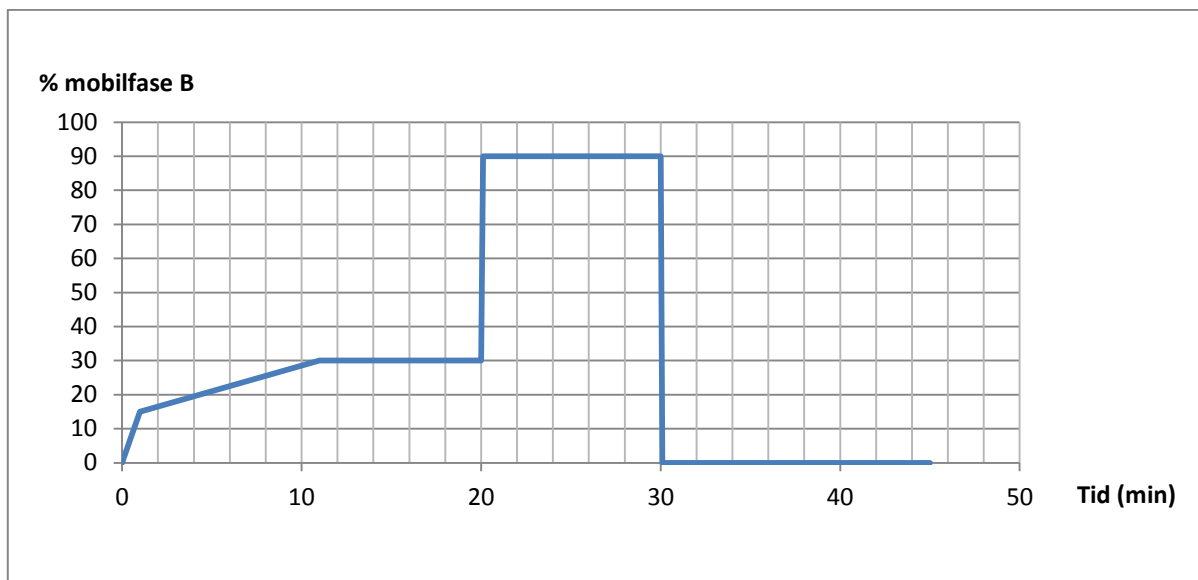
Figur 10: Mobilfasegradient for HPLC-UV

3.8 LC-MS

LC-MS ble gjennomført på et system bestående av en Dionex UltiMate 3000 WPS 3000 TSL autosampler, en LPG 3300 pumpe og en SRD 3300 degasser koblet til et Thermo Scientific LTQ XL Linear Ion Trap Mass Spectrometer (alle komponentene var fra Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Software var av typen Xalibur version 2.1 fra Thermo Scientific. Til den kromatografiske separasjonen ble det benyttet en Gemini C18 omvendt-fase kolonne (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Lengden på kolonnen var 150 mm og den indre diameteren 1.0 mm. Partikkelstørrelsen var 5 μm og porestørrelsen 110 \AA .

Det ble benyttet gradienteluering som vist i Figur 11. Total analysetid per prøve var 45 minutter. Mobilfasehastigheten var 50 $\mu\text{l}/\text{min}$ fra 0-20 minutter og 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ fra 20-45 minutter. Injeksjonsvolumet var 5 μl .

Analysene ble utført med elektroprayionisering (ESI) i positiv mode, og det ble benyttet selektiv reaksjonsmonitorering (SRM). Detaljene for scan er vist i Tabell 5.



Figur 11: Mobilfasegradient for LC-MS

Tabell 5: Detaljer for MS-scan

Modellanalytt	Molekylion	Produktion	CID
Amitriptylin	278,17	116,9 233,1	43 %
Haloperidol	376,12	122,9 165,0 358,2	37 %
Fluoxetin	310,05	147,9	17 %
Quetiapin	384,16	253,0	39 %

3.9 Evaluering

Det ble gjennomført en evaluering av fellingsmetoden, der linearitet, repeterbarhet, deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) ble undersøkt. To tørkede bloddråper ble brukt til hver parallell. Disse ble løst i 500 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) under resting på en Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) 1400 rpm ved 21 °C. Felling ble gjennomført på samme måte som beskrevet i kapittel 3.5.2, og ekstraktene ble analysert på LC-MS som beskrevet i kapittel 3.8.

3.9.1 Linearitet

Lineariteten ble undersøkt i konsentrasjonsområdet 10-1000 ng/ml. Blankt fullblod ble tilsatt modellanalytter til en konsentrasjon på 1000 ng/ml (prøveløsning 6). Denne ble fortynnet videre med fullblod, og følgende konsentrasjoner ble benyttet: 10 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml og 1000 ng/ml. Det ble gjennomført tre paralleller for konsentrasjonene 250 ng/ml og 750 ng/ml. For de øvrige konsentrasjonene ble det gjennomført seks paralleller. Det ble laget en linearitetskurve og korrelasjonskoeffisienten (r^2) ble bestemt.

3.9.2 Repeterbarhet

Det ble beregnet RSD-verdi for hver av følgende konsentrasjoner; 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml og 1000 ng/ml, (n=6).

3.9.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD) og kvantifiseringsgrensen (LOQ) ble bestemt for quetiapin. Topp høyden og høyden av støy ble målt, og LOD og LOQ ble beregnet som S/N lik henholdsvis 3 og 10.

3.10 Beregninger

3.10.1 Utbytte

Utbyttet (R) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$R = \frac{C_e V_e}{C_p V_p} \cdot 100 \%$$

Der C_e er den endelige konsentrasjonen av analytt i ekstraktet, V_e er volumet av ekstraktet, C_p er den opprinnelige konsentrasjonen av analytt i prøven og V_p er prøvevolumet [11].

3.10.2 Relativt standardavvik

Relativt standardavvik (RSD) ble beregnet ut fra følgende formel:

$$RSD = \frac{s}{x} \cdot 100 \%$$

Der s er standardavviket og x er gjennomsnittet for målingene [11].

3.10.3 Oppkonsentrering

Oppkonsentrering (E) ble beregnet ved hjelp av følgende formel:

$$E = \frac{C_e}{C_p}$$

Der C_e er den endelige konsentrasjonen av analytt i ekstraktet og C_p er konsentrasjonen av analytt i den opprinnelige prøven [11].

3.10.4 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

LOD ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{LOD} = C \cdot 3 \cdot \frac{h}{H}$$

Der C er konsentrasjonen av analytt i den opprinnelige blodprøven, h er høyden til støyen og H er topphøyden [11].

LOQ ble beregnet ut fra følgende formel:

$$\text{LOQ} = C \cdot 10 \cdot \frac{h}{H}$$

Der C er konsentrasjonen av analytt i den opprinnelige blodprøven, h er høyden til støyen og H er topphøyden [11].

3.10.5 T-test

For å undersøke om to serier med prøveresultater er signifikant forskjellige eller ikke kan det gjennomføres en t-test. Først beregnes felles standardavvik (s_{felles}) for begge prøveseriene ved bruk av følgende formel:

$$s_{felles} = \sqrt{\frac{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}{n_1+n_2-2}}$$

s_1 og s_2 er standardavvikene for de to prøveseriene og n_1 og n_2 er antall prøver i hver serie. Deretter beregnes en t-verdi ved hjelp av følgende formel:

$$t = \frac{|x_1 - x_2|}{s_{felles}} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

x_1 og x_2 er gjennomsnittet til de to prøveseriene. Antall frihetsgrader er $n_1 + n_2 - 2$. Den beregnede t-verdien sammenlignes med tilhørende verdi i tabell [11] for valgte konfidensnivå. I dette arbeidet ble det brukt 95 % konfidensnivå. Hvis beregnet t-verdi er høyere enn tabellverdien er de to prøveseriene signifikant forskjellige med 95 % sikkerhet. Dersom den beregnede t-verdien er lavere enn tabellverdien er resultatene ikke signifikant forskjellige [11].

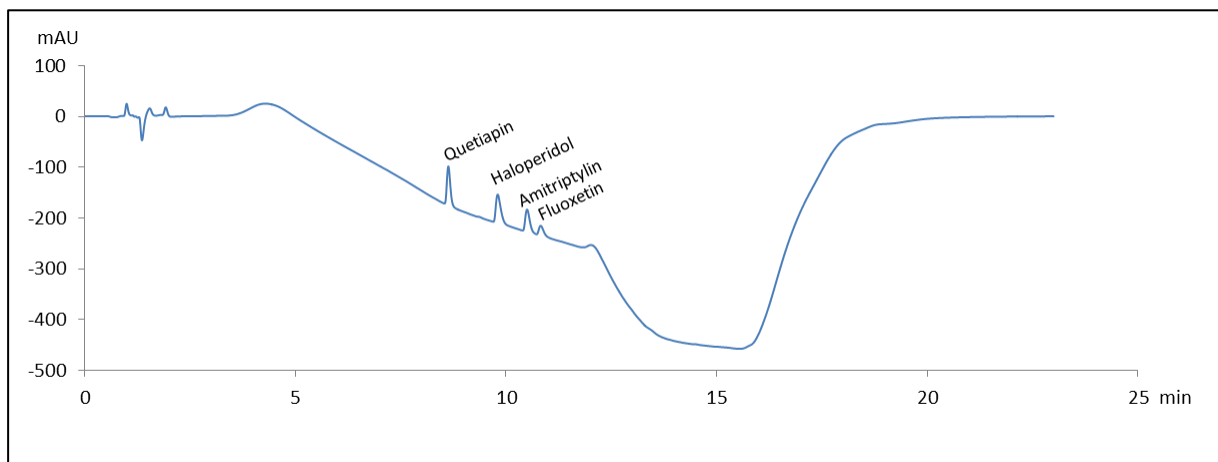
4 Resultater og diskusjon

4.1 Innledende forsøk

4.1.1 Retensjonsrekkefølge

Når man bruker HPLC-UV til å analysere prøver er arealet under toppene i kromatogrammet proporsjonalt med konsentrasjonen av analytt i prøveløsningen [11]. Dette kan brukes til å bestemme utbyttet og det er derfor nødvendig å vite retensjonsrekkefølgen til analyttene slik at man vet hvilke topper i kromatogrammet som hører til hver enkelt analytt.

Retensjonsrekkefølgen til de fire modellanalyttene ble bestemt ved å analysere løsninger med analyttene hver for seg med HPLC-UV. Disse kromatogrammene ble deretter sammenlignet med et kromatogram med en blanding av de fire modellanalyttene. Resultatet er vist i Figur 12. Den skjeve grunnlinjen i kromatogrammet skyldes trolig at maursyre i mobilfasen har UV-absorbans ved den detekterte bølgelengden.



Figur 12: Retensjonsrekkefølge for modellanalyttene på HPLC-UV

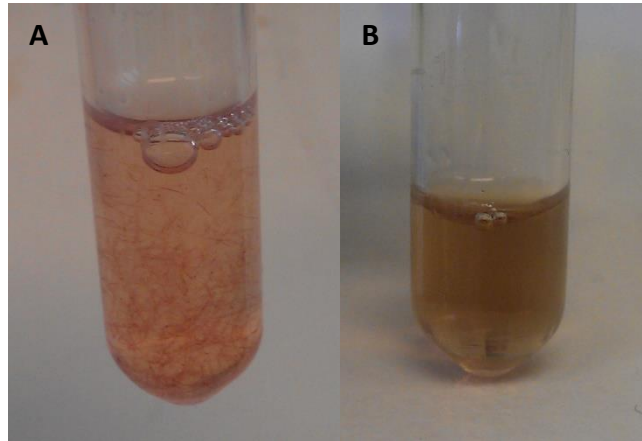
4.2 Materiale og oppløsningsmedium for *dried blood spots*

I oppstarten av arbeidet ble det forsøkt to ulike materialer til å avsette blodprøvene på; Aquacel og Durafiber (Smith & Nephew, Hull, England). Begge materialene er kommersielt tilgjengelige, noe som var ønskelig for at metodene lettere skal kunne tas i bruk. Aquacel består av 100 % natrium karboksymetylcellulose (CMC) [31], mens Durafiber består av 20 % cellulosefibre og 80 % geldannende celluloseetyl sulfonatfibre [34]. CMC er et kjent materiale og er derfor lettere å finne informasjon om enn materialet i Durafiber, som er mer ukjent. Det ble derfor valgt å benytte Aquacel i det videre arbeidet.

Etter at blodprøvene var tørket på materialet ble de stanset ut og løst opp i et egnet oppløsningsmedium. Ved oppløsning av *dried blood spots* (DBS) ble det en relativt stor fortykning av prøvene fordi hver DBS, som bestod av kun 5 µl blod, ble løst opp i 500 µl væske før felling og *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME), og 1 ml før fast-fase ekstraksjon (SPE). Prøvene ble deretter oppkonsentrert igjen ved bruk av de ulike prøveopparbeidelsesmetodene. Totalt sett ble det likevel en fortykning av prøvene fra blod til sluttekstrakt. Når analysene ble gjennomført med LC-MS var dette i midlertid ikke noe problem fordi instrumentet har høy sensitivitet.

4.2.1 Oppløsning av *dried blood spots* før fast-fase ekstraksjon og felling

Til oppløsning av DBS før SPE ble det først forsøkt å bruke en acetatbuffer (pH 5,0). Det viste seg i midlertid at det var vanskelig å løse CMC i denne bufferen og det ble forsøkt å øke pH ved å bytte til en fosfatbuffer (pH 6,0). Dette fungerte bedre og ble derfor valgt å bruke videre som oppløsningsmedium for forsøkene med både SPE og felling. Oppløsning av DBS i 25 mM fosfatbuffer tok 15-20 minutter. Når DBS ble løst opp i denne fosfatbufferen gikk ikke alt i fullstendig oppløsning, se Figur 13A. Dette hadde i midlertid ingen betydning for utbyttet, som var høyt til tross for at alt materialet ikke var helt oppløst.



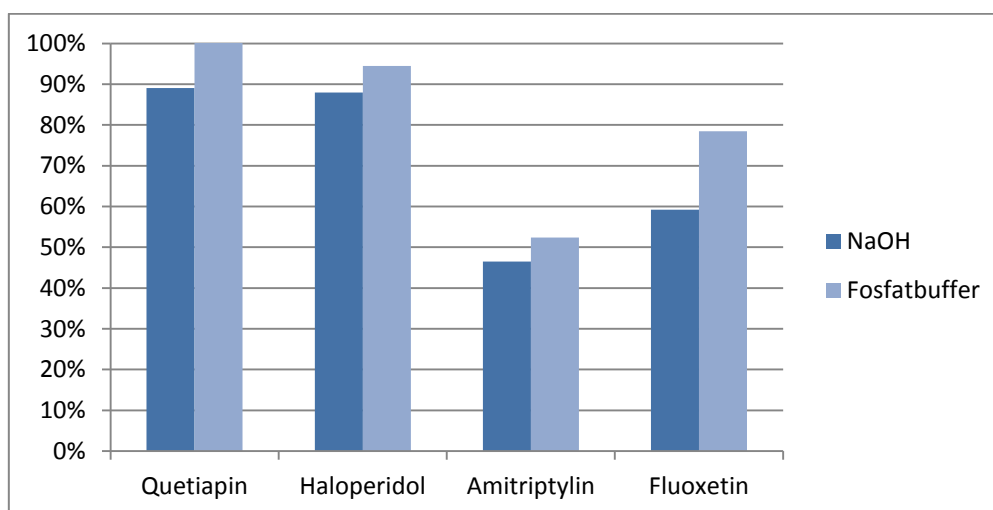
Figur 13: Oppløst DBS i A) 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) og B) 10 mM NaOH

4.2.2 Oppløsning av *dried blood spots* før *parallel artificial liquid membrane extraction*

Når PALME skal benyttes som prøveopparbeidelsesmetode er det vesentlig at pH i donorfasen er regulert slik at analyttene er på uladet form. For basiske analytter betyr det at pH i donorfasen må være høy. I dette arbeidet ble oppløste DBS brukt direkte som donorfase og oppløsningsmediet måtte derfor ha høy pH. Det ble testet to ulike oppløsningsmedier; 10 mM NaOH og 25 mM fosfatbuffer (pH 10,7), for å se hvilket som fungerte best i forhold til oppløsningstid og om oppløsningsmediet hadde innvirkning på ekstraksjonsutbyttet.

Når man gjør legemiddelanalyser er det ofte ønskelig å bruke kortest mulig tid slik at prosessen effektiviseres og man kan gjøre flere analyser i løpet av et gitt tidsrom. En måte å effektivisere prosessen er å forkorte tiden det tar å opparbeide prøvene før analyse. I den forbindelse var det ønskelig å se hvilket oppløsningsmedium som ga raskest oppløsning av DBS. Oppløsningstid ble testet ved å løse DBS i 500 μ l av henholdsvis 10 mM NaOH og 25 mM fosfatbuffer (pH 10,7). Det ble gjort tre paralleller for hvert oppløsningsmedium. Oppløsningen ble gjort under risting ved 1400 rpm og for hvert minutt ble det undersøkt om prøvene var fullstendig oppløst. Resultatet av forsøket var at de tre prøvene som ble løst i NaOH var oppløst etter 6,7 og 9 minutter. For fosfatbufferen var den ene prøven løst etter 14 minutter, mens de to andre fortsatt ikke var fullstendig oppløst etter 40 minutter. Dette tydet på at NaOH var best egnet som oppløsningsmedium med tanke på oppløsningstid.

For å undersøke om ekstraksjonsutbyttet var avhengig av hvilket oppløsningsmedium som ble brukt, ble det ekstrahert modellanalytter fra oppløste DBS (fra prøveløsning 1) med henholdsvis NaOH og fosfatbuffer som oppløsningsmedium, og PALME-utbyttene ble sammenlignet. Det ble gjort to paralleller for hvert oppløsningsmedium. Resultatet er vist i Figur 14. Jevnt over ligger fosfatbufferen noe høyere i ekstraksjonsutbytte enn NaOH. På bakgrunn av den lange oppløsningstiden av DBS med fosfatbufferen ble det likevel valgt å fortsette med NaOH som oppløsningsmedium. For bilde av DBS oppløst i NaOH, se Figur 13B.



Figur 14: PALME-utbytte med ulike oppløsningsmedier (n=2)

Prøveløsning: 5 µl fullblod tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 10 mM NaOH eller 25 mM fosfatbuffer (pH 10,7); organisk væskemembran: 2,5 µl diheksyleter; akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre; ristehastighet: 1200 rpm

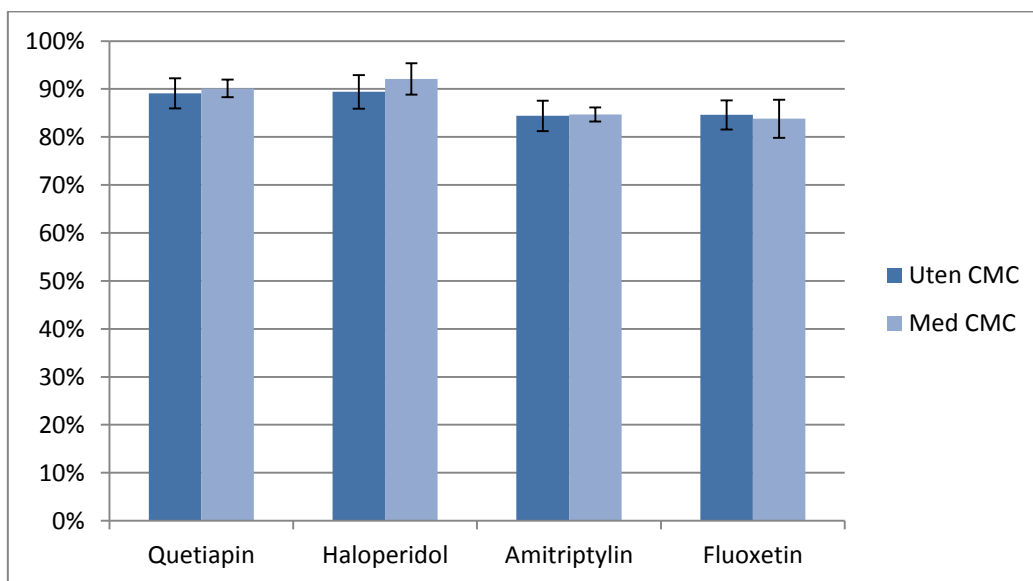
4.3 Dried blood spots kombinert med fast-fase ekstraksjon

Metoden som ble benyttet til SPE var opprinnelig fra produsenten av SPE-kolonnen som ble benyttet (Waters), og var i utgangspunktet for legemidlet klozapin i plasma. Metoden beskriver bruken av samme kolonne som ble benyttet i dette arbeidet og klozapin har relativt like egenskaper som modellanalyttene i dette arbeidet, i forhold til hydrofobisitet og pK_a. Metoden ble derfor ansett som et bra utgangspunkt. I den opprinnelige metoden ble prøven

reløst i 100 µl væske etter inndamping. På grunn av mye variasjon i ekstraksjonsutbytte i de første forsøkene ble det forsøkt å øke reløsvolumet til 200 µl. Dette viste seg å gi mye mindre variasjon og reløsvolumet ble derfor endret til 200 µl i de videre forsøkene. Ved ekstraksjon av de fire modellanalyttene fra 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0) (prøveløsning 3), lå utbyttet mellom 80-90 % og RSD < 5 % (n=5). Dette tydet på at metoden var godt egnet til å ekstrahere de fire modellanalyttene. Denne SPE-metoden ga totalt sett 40 ganger fortykning av prøven fra blod til sluttekstrakt.

4.3.1 Polymerens påvirkning

Når DBS løses opp fullstendig får man en prøveløsning som i tillegg til analyttene, også inneholder CMC og blodkomponenter. For å undersøke om CMC påvirket ekstraksjonsutbyttet ble modellanalyttene ekstrahert fra løsninger med og uten CMC (henholdsvis prøveløsning 2 og 3), og utbyttene sammenlignet. Det ble gjort fem paralleller for hver av prøveløsningene, og resultatet er vist i Figur 15. Det var ikke signifikant forskjell i ekstraksjonsutbyttet med og uten CMC til stede. Dette tydet på at polymeren ikke hadde noen påvirkning på ekstraksjonsutbyttet og at CMC derfor var godt egnet som materiale for DBS.



Figur 15: Ekstraksjonsutbytte fra SPE med og uten CMC i prøveløsningen (n=5)

Prøveløsning: 2,0 ml løsning av modellanalytter 40 µg/ml i 20 mM maursyre, 8 ml 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0), med eller uten CMC; SPE-kolonne: Oasis MCX; reløsvæske: 200 µl mobilfase A

4.3.2 Blodets påvirkning

Etter å ha vist at metoden fungerte til å ekstrahere de fire modellanalyttene og at polymeren ikke påvirket ekstraksjonsutbyttet ble det forsøkt å ekstrahere modellanalyttene fra oppløste DBS (fra prøveløsning 1). Det viste seg å være vanskelig å trekke prøven gjennom kolonnen fordi den delvis ble tettet igjen av prøveløsningen. Når analyttene skulle elueres ut fulgte det også med en god del forurensninger som sannsynligvis stammet fra blodkomponenter i prøveløsningen. Disse gjorde at eluatet fikk en gjennomsiktig grønn farge. Til tross for at eluatet var synlig forurenset ble det forsøkt å analysere det med HPLC-UV, resultatet er vist i Tabell 6. Ekstraksjonsutbyttene ligger høyt og variasjonen er liten. At eluatene var så tydelig forurenset er i midlertid ugunstig da de kan påvirke HPLC-systemets levetid. Ved senere forsøk med samme ekstraksjonsmetode ble flere av kromatogrammene i tillegg så forstyrret av forurensningene at det ikke var mulig å identifisere toppene fra modellanalyttene. Det ble på nytt undersøkt om polymeren kunne være årsak til problemene som oppstod, ved gjennomføre metoden med en prøveløsning uten CMC, som bestod av 5 µl fullblod tilsatt modellanalyttene og 1 ml 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0). Eluatet ble fortsatt grønnfarget og skittent, noe som tydet på at det ikke var CMC, men blodkomponenter som var skyld i det skitne eluatet. Med bakgrunn i disse resultatene ble det valgt å ikke fortsette med SPE-metoden i denne omgang, men heller fortsette med de andre prøveopparbeidelsesmetodene. Det betyr i midlertid ikke at DBS ikke kan kombineres med SPE, men at blodkomponentene i prøveløsningen er en utfordring og at det er behov for mer arbeid i forhold til om det kan la seg gjøre å kombinere DBS og SPE.

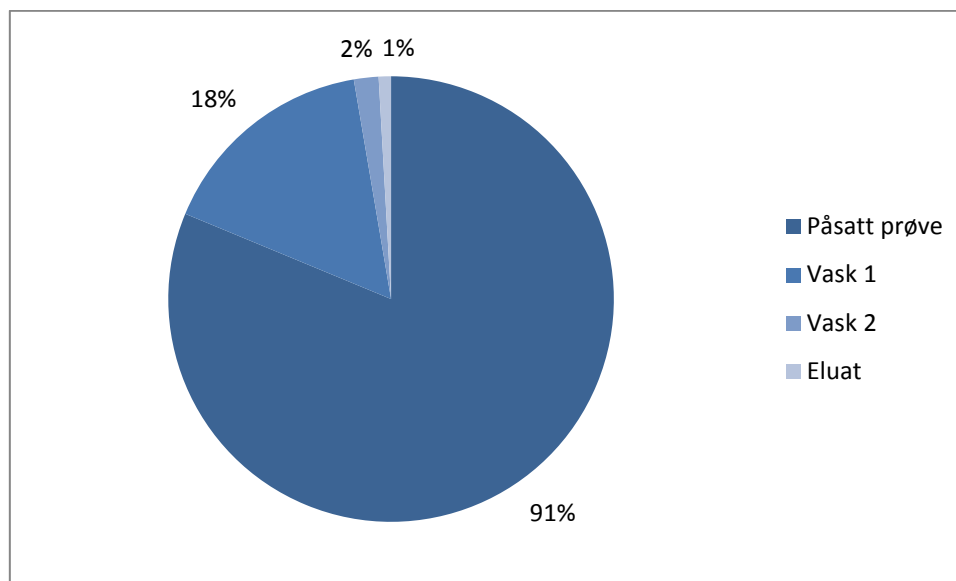
Tabell 6: Ekstraksjonsutbytte og RSD for SPE av oppløste DBS (n=3)

Modellanalytt	Utbytte (%)	RSD (%)
Quetiapin	90,0	1,2
Haloperidol	72,2	5,0
Amitriptylin	79,6	5,4
Fluoxetin	66,9	2,6

Prøveløsning: 5 µl fullblod tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml, tørket på CMC og oppløst i 1 ml 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); SPE-kolonne: Oasis MCX; reløsingvæske: 200 µl mobilfase A

4.3.3 Måling av CMC

Ved å løse opp DBS fullstendig får man en prøveløsning som også består av CMC. For at CMC ikke skal komme inn i analysesystemet, der det kan felle ut og tette systemet, er det ønskelig at den fjernes i løpet av prøveopparbeidelsesmetoden. For å undersøke hvor mye CMC som ble fjernet fra prøven ved bruk av SPE med mixed mode ble det gjennomført en fargereaksjon og måling av CMC som beskrevet i kapittel 3.6. Det ble gjort målinger av CMC i prøveløsningen før og etter prøvepåsettelse, i begge vaskeløsningene og i eluatet. Det ble også laget en blankprøve bestående av vann. Det ble gjort samme fargereaksjon og absorbansmåling for blankprøven som for de andre løsningene. Absorbansen som ble målt i blankprøven ble trukket fra absorbansen som ble målt i løsningene fra SPE. Andel CMC i de ulike løsningene ble beregnet som prosent av absorbansen til prøveløsningen før påsettelse på kolonnen. Resultatene (Figur 16) viste at det meste av CMC forsvant rett gjennom kolonnen ved prøvepåsettelse, eller ble vasket ut med de to vaskeløsningene. Kun ca 1 % kom ut sammen med eluatet. Når man gjør SPE vil det før prøvepåsettelsen være væske på kolonnen fra kondisjoneringen. Når væske trekkes gjennom kolonnen har man heller ikke helt kontroll på hvor mye som kommer ut, fordi noe vil bli værende igjen på kolonnen. Den manglende volumkontrollen gjorde det vanskelig å gjøre nøyaktige målinger av CMC i hvert enkelt trinn, og dette forsøket ga derfor kun et grovt estimat på hva som skjer med CMC etter den er påsatt på kolonnen. Det ga likevel en indikasjon på at det meste av CMC forsvinner i løpet av prøveopparbeidelsen, og at kun en liten andel blir igjen i eluatet. Med beregningene fra dette forsøket ble den totale andelen CMC etter prøvepåsettelse over 100 %. Dette kan skyldes den manglende volumkontrollen og at spektrofotometeret kun ble nullstilt mot vann. Etter som det ble brukt andre løsemidler i de ulike trinnene i ekstraksjonen kan det eventuelt være bakgrunnssignaler fra disse som det ikke ble korrigert for.



Figur 16: Andel gjenværende CMC i ulike løsninger fra SPE
 Prøveløsning: 1 ml løsning av CMC i 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); SPE-kolonne: Oasis MCX

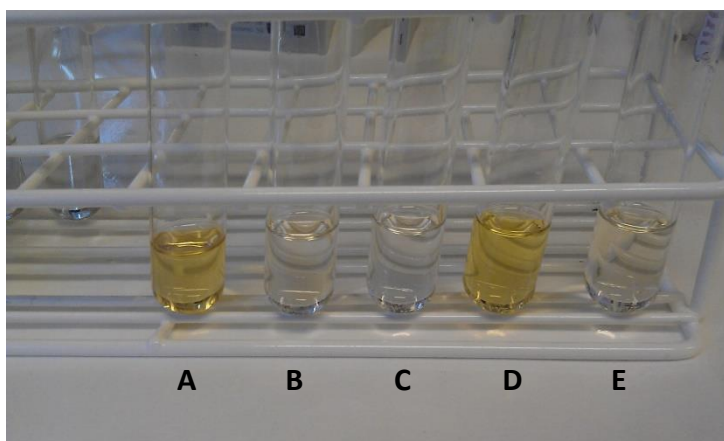
4.4 Dried blood spots kombinert med felling

4.4.1 Fellingsreagens

Det ble testet ulike fellingsreagenser for å se hvilket som egnet seg best. I disse forsøkene var det vesentlig at fellingsreagenset hadde evne til å felle ut både proteinene i blodet og CMC fra prøveløsningen. Det ble valgt ut tre forskjellige fellingsreagenser; kald acetonitril, 10 % trikloreddiksyre i vann og metanol:0,2 M ZnSO₄ (70:30). Disse representerer de tre hovedgruppene av fellingsreagenser; organiske løsemidler, syrer og metallioner, og er blant de vanligste fellingsreagensene [10]. Trikloreddiksyre var, i tillegg til å være et godt kjent fellingsreagens for proteiner, også aktuelt fordi CMC er uløselig ved pH lavere enn 4,0 [35]. Metanol:0,2 M ZnSO₄ ble valgt fordi CMC feller ut i nærvær av ZnSO₄ [35], samt at dette fellingsreagenset tidligere har vært brukt i kombinasjon med DBS [36].

Felling ble gjennomført på en 500 µl prøveløsning av oppløst CMC (prøveløsning 5) med 500 µl av de ulike fellingsreagensene. For acetonitril ble det i tillegg til 500 µl også forsøkt med 1000 µl for å se om volumet kunne være av betydning. For hvert fellingsreagens ble det gjennomført to paralleller. Etter sentrifugering av prøvene ble det gjennomført en fargereaksjon og måling av CMC i supernatanten, som beskrevet i kapittel 3.6. Før måling av

absorbans med ulike fellingsreagenser ble spektrofotometeret nullstilt mot en løsning bestående av de samme komponentene som prøveløsningene, men uten CMC. Disse løsningene var opparbeidet på samme måte som prøveløsningene med CMC. Resultatet av fargereaksjonen, der sterkere farge indikerte mer CMC, er vist i Figur 17. Andelen gjenværende CMC etter felling ble bestemt som forholdet mellom absorbansen som ble målt for supernatanten og absorbansen som ble målt for en prøveløsning av CMC som ikke hadde blitt tilsatt fellingsreagens. Andelen utfelt CMC ble bestemt ut fra andelen gjenværende CMC. Tabell 7 viser at det mest effektive fellingsreagenset for å fjerne CMC fra prøveløsningen var acetonitril, og at mengden acetonitril hadde betydning for effektiviteten. Metanol:ZnSO₄ fungerte relativt bra med tanke på hvor mye CMC som ble felt ut, men var problematisk å bruke fordi Zn²⁺ fra fellingsreagenset felte ut med PO₄²⁻ fra bufferen som prøven var løst i. På bakgrunn av dette forsøket ble det valgt å bruke acetonitril som fellingsreagens.



Figur 17: Visualisering av CMC etter felling med A) ingen fellingsreagens, B) 500 µl acetonitril, C) 1000 µl acetonitril, D) 500 µl 10 % trikloreddiksyre og E) metanol:0,2 M ZnSO₄ (70:30)

Tabell 7: Andel utfelt CMC med ulike fellingsreagenser (n=2)

Fellingsreagens	500 µl acetonitril	1000 µl acetonitril	500 µl trikloreddiksyre	500 µl Metanol:ZnSO ₄
Andel utfelt CMC (%)	97,3	99,7	43,0	94,2

Prøveløsning: 500 µl oppløst CMC i 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: variert; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm

4.4.2 Volum av fellingsreagens

Fordi forsøket med valg av fellingsreagens indikerte at volumet av acetonitril hadde en innvirkning på hvor mye CMC som ble felt ut, ble det undersøkt hvilket volum som var mest effektivt. Felling ble gjennomført på en 500 µl prøveløsning av oppløst CMC (prøveløsning 5) med henholdsvis 250 µl, 500 µl, 750 µl og 1000 µl acetonitril, tre paralleller av hver. Etter sentrifugering ble det gjort fargereaksjon og måling av CMC som beskrevet i kapittel 3.6. Før absorbansmålingen ble spektrofotometeret nullstilt mot en løsning bestående av de samme komponentene som prøveløsningene, men uten CMC. Disse løsningene var opparbeidet på samme måte som prøveløsningene med CMC. Andelen utfelt CMC ble beregnet og resultatet vises i Tabell 8.

Felling som prøveopparbeidelsesmetode kan føre til en fortykning av prøveløsningen, noe som kan gi redusert sensitivitet for metoden. For å begrense fortykningen ved tilsetning av fellingsreagens var det ønskelig å bruke det laveste effektive volumet av acetonitril. Samtidig var det viktig at mest mulig CMC ble fjernet før analyse slik at den ikke felte ut og tettet HPLC-systemet. Fordi forskjellen i effektivitet mellom 750 µl og 1000 µl acetonitril var så liten ble det derfor valgt å bruke 750 µl acetonitril i de videre forsøkene.

Tabell 8: Andel utfelt CMC med ulike volum acetonitril (n=3)

Volum acetonitril	250 µl	500 µl	750 µl	1000 µl
Andel utfelt CMC (%)	92,9	96,5	99,4	99,8

Prøveløsning: 500 µl oppløst CMC i 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: acetonitril; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm

4.4.3 Utbytte og RSD

Etter optimalisering av fellingsreagens og -volum ble metoden gjennomført med DBS (fra prøveløsning 1). Det ble gjort fem paralleller, og gjennomsnittlig utbytte og RSD-verdier for de fire modellanalyttene er vist i Tabell 9. Metoden ga høye utbytter og lave RSD-verdier (<10 %) for alle de fire analyttene. Fra blod til sluttekstrakt ga denne metoden en 100 ganger fortykning av prøven.

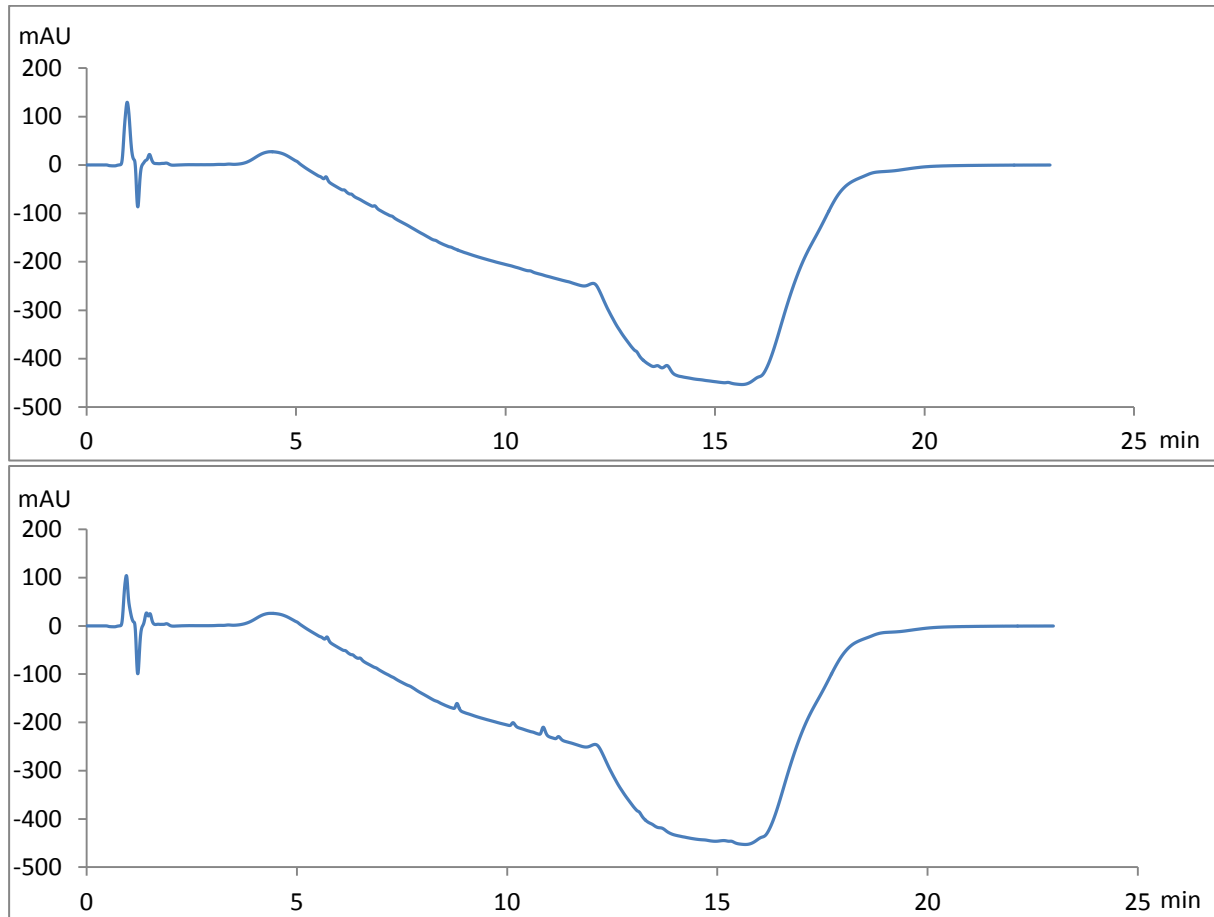
Tabell 9: Utbytte og RSD etter felling av oppløste DBS (n=5)

Modellanalytt	Utbytte (%)	RSD (%)
Quetiapin	87,2	5,7
Haloperidol	96,3	7,2
Amitriptylin	93,9	5,6
Fluoxetin	95,6	8,5

Prøveløsning: 5 µl fullblod tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml oppløst i 500 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: 750 µl acetonitril; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm; reløsvingsvæske: 200 µl mobilfase A

4.4.4 Felling av oppløste *dried blood spots* uten modellanalytter

Det ble gjort felling av oppløste DBS med kun blod (uten modellanalyttene) for å se om det ga bakgrunnssignaler i kromatogrammet. Kromatogrammer fra analyse med og uten modellanalytter til stede er vist i Figur 18. Det ble funnet en liten topp med retensjonstid rundt 10,58. Denne hadde ikke samme retensjonstid som noen av modellanalyttene, men var nærliggende da to av analyttene hadde retensjonstid rundt henholdsvis 10,13 og 10,85. Toppen i kromatogrammet ble i midlertid også funnet da det ble analysert en prøve kun bestående av mobilfase. Det ble vurdert at toppen ikke ville påvirke analyseresultatene i betydelig grad.



Figur 18: Kromatogrammer fra analyse etter felling av oppløste DBS med (nederst) og uten (øverst) modellanalytter på HPLC-UV

Prøveløsning: 5 μ l fullblod med eller uten tilsatt modellanalytter til 40 μ g/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 μ l 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: 750 μ l acetonitril; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm; reløsingvæske: 200 μ l mobilfase A

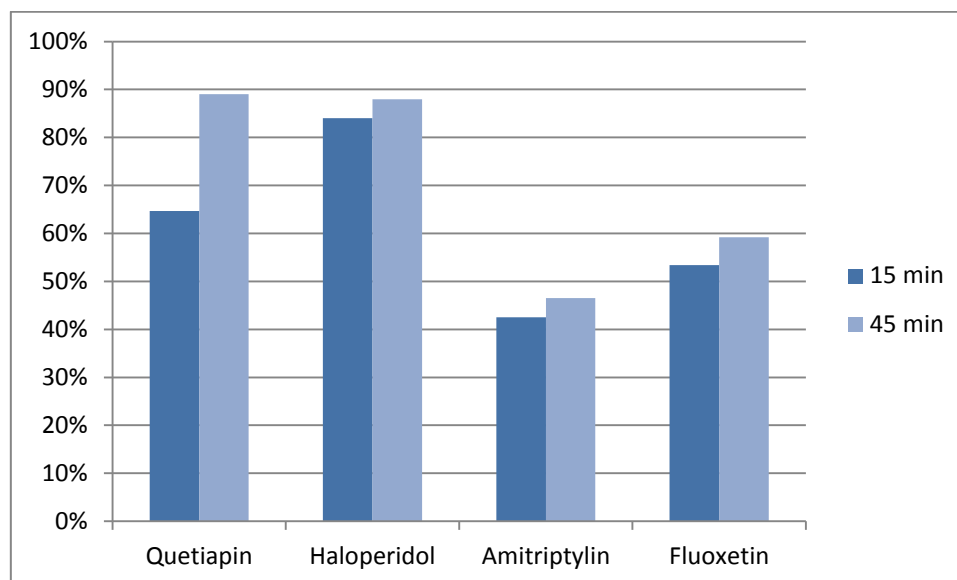
4.5 Dried blood spots kombinert med *parallel artificial liquid membrane extraction*

På grunn av erfaring fra tidligere forsøk med PALME [12], der det ble vist at modellanalyttene delvis binder seg til polyvinylidenfluorid (PVDF)-membranen i den kommersielt tilgjengelige 96-brønnsplaten (Millipore), ble akseptorplaten i oppsettet byttet ut med en hjemmelaget «akseptorplate» med polypropylenmembran. Diheksyleter ble benyttet som organisk fase, prøvevolumet var 250 μ l og volumet av akseptorfase var 50 μ l. Disse parameterne ble ikke optimalisert, men var basert på tidligere optimalisering av PALME-

parametre [12]. 20 mM HCOOH ble brukt som akseptorfase. Valget av akseptorfase var basert på tidligere arbeid med PALME og HF-LMPE [12, 37].

4.5.1 Ekstraksjonstid

For å undersøke hvordan ekstraksjonstiden påvirket ekstraksjonsutbyttet ble det gjennomført forsøk med 15 og 45 minutter ekstraksjonstid. Modellanalyttene ble ekstrahert fra oppløste DBS (fra prøveløsning 1), og det ble gjennomført to paralleller for hver ekstraksjonstid. Resultatet er vist i Figur 19. Ekstraksjonsutbyttet lå jevnt over noe høyere ved 45 minutter ekstraksjonstid og parallelle forsøk i forskningsgruppen har vist økte ekstraksjonsutbytter med lenger ekstraksjonstid (personlig meddelelse). Det ble derfor valgt å fortsette med 45 minutter ekstraksjonstid i de videre forsøkene. Før metoden kan tas i bruk bør i midlertid ekstraksjonstiden optimaliseres ytterligere. Det bør undersøkes flere tidspunkter med flere paralleller for hvert tidspunkt, før den optimale ekstraksjonstiden kan fastsettes.



Figur 19: PALME-utbytte fra DBS etter henholdsvis 15 og 45 minutter ekstraksjon (n=2)

Prøveløsning: 5 µl fullblod tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 10 mM NaOH; organisk væskemembran: 2,5 µl diheksyleter; akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre; ristehastighet: 1200 rpm

4.5.2 Ekstraksjonsutbytte og RSD

Etter valg av oppløsningsmedium og ekstraksjonstid ble metoden gjennomført for DBS (fra prøveløsning 1). Fem paralleller ble gjennomført, og gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD ble beregnet. Resultatet er vist i Tabell 10. Utbyttene lå relativt høyt, men var noe lavere for amitriptylin. Med tanke på log P-verdiene til modellanalyttene (se Tabell 1) kan det se ut som om ekstraksjonsutbyttet ble lavere desto høyere log P er. Dette kan forklares med at høy log P tilsier at analyttene har større affinitet for den organiske fasen og derfor ikke like lett ekstraheres over i den vandige akseptorfase. RSD-verdiene var lave (<10 %) for alle modellanalyttene og viste dermed at det var liten variasjon mellom parallellene. Metoden ga totalt sett en 20 ganger fortynning av prøven fra blod til sluttekstrakt. Sammenlignet med SPE og felling, ga PALME dermed den laveste graden av fortynning.

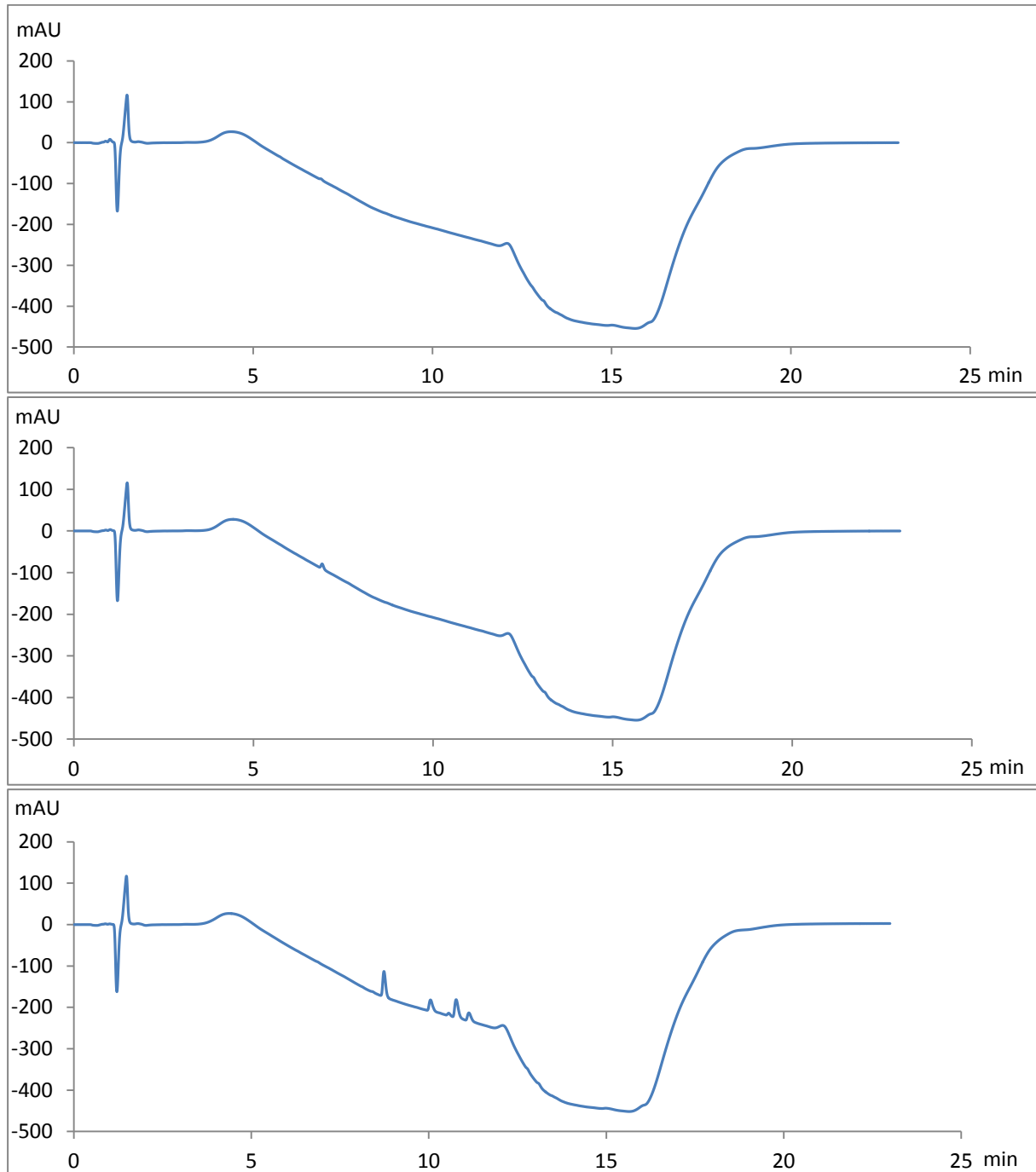
Tabell 10: Ekstraksjonsutbytte og RSD etter PALME av oppløste DBS (n=5)

Modellanalytt	Utbytte (%)	RSD (%)
Quetiapin	89,3	6,3
Haloperidol	73,4	8,1
Amitriptylin	49,4	8,7
Fluoxetin	61,4	7,8

Prøveløsning: 5 µl fullblod tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 10 mM NaOH; organisk væskemembran: 2,5 µl diheksyleter; akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre; ristehastighet: 1200 rpm

4.5.3 Ekstraksjon av oppløst CMC og *dried blood spots* uten modellanalytter

Det ble gjennomført PALME av prøver bestående av kun oppløst CMC (prøveløsning 5) og av DBS med kun blod (uten modellanalytter) for å undersøke om dette ga bakgrunnssignaler i kromatogrammet, som dermed kunne innvirke på resultatene slik at disse ble ukorrekte. Kromatogrammer fra analysene er vist i Figur 20. Det ble funnet enkelte topper i kromatogrammene, men disse kom i et annet tidsintervall enn toppene for modellanalyttene. Det ble derfor vurdert at disse ikke hadde noen innvirkning på resultatene.



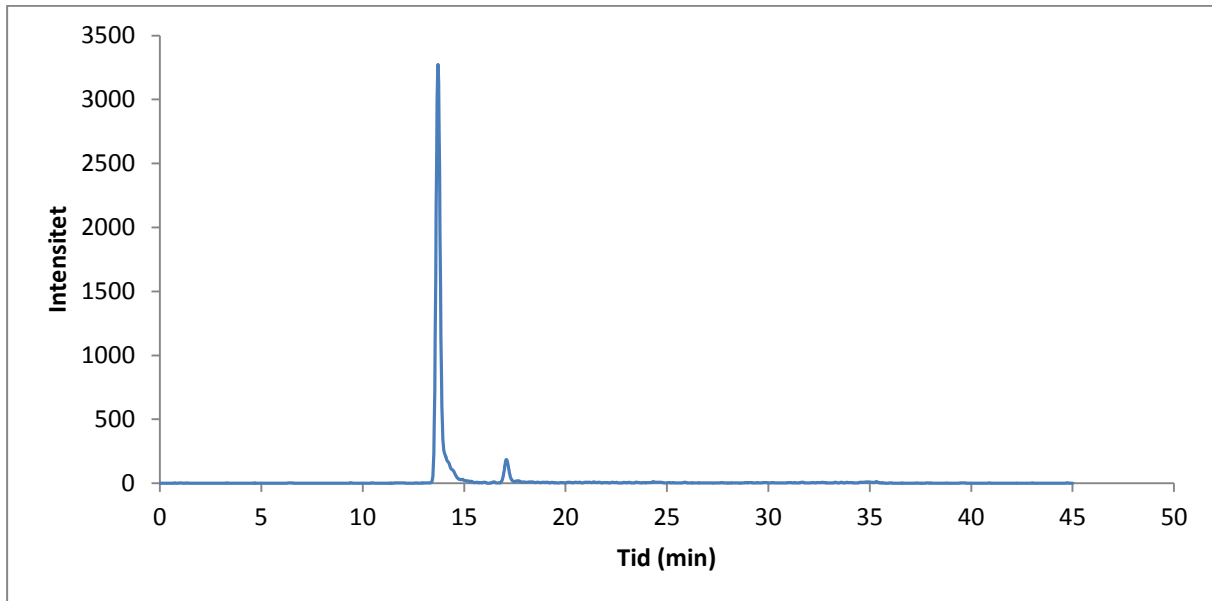
Figur 20: Kromatogrammer fra analyse etter PALME av oppløst CMC (øverst), oppløste DBS uten (i midten) og med (nederst) modellanalytter på HPLC-UV
Prøveløsning: oppløst CMC, eller 5 µl fullblod med eller uten tilsatt modellanalytter til 40 µg/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 10 mM NaOH; organisk væskemembran: 2,5 µl diheksyleter; akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre; ristehastighet: 1200 rpm

4.5.4 Måling av CMC

Det ble gjort forsøk på å måle CMC i akseptorfasen i PALME, men på grunn av lite volum av akseptorfasen og behovet for et noe større volum for å kunne måle absorbansen på spektrofotometeret ble dette vanskelig. Alternativt kunne flere akseptorfaser fra PALME blitt slått sammen for å øke volumet, men dette forsøket ble det ikke tid til å gjennomføre. Basert på egenskapene til CMC, som størrelsen på molekylet og de sure gruppene, er det lite trolig at den passerer den organiske fasen og vil være tilstede i akseptorfasen. Dette bør i midlertid undersøkes nærmere.

4.6 Evaluering

Det ble gjennomført en evaluering av metoden for felling i kombinasjon med DBS. Blodprøver med konsentrasjonene 10 ng/ml, 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml og 1000 ng/ml (prøveløsning 6) ble avsatt som DBS. To DBS fra hver konsentrasjon ble oppløst i 500 µl 10 mM NaOH tilsatt 750 µl acetonitril for å felle ut proteiner og CMC. Det ble gjennomført seks paralleller for konsentrasjonene 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml og 1000 ng/ml. For konsentrasjonene 250 ng/ml og 750 ng/ml ble det gjort tre paralleller. Evalueringen ble gjennomført for alle de fire modellanalyttene, men kun resultatene for quetiapin er gjengitt her. Dette skyldes utfordringer med LC-MS-instrumentet, der det var betydelige signaler for de øvrige analyttene; amitriptylin, fluoxetin og haloperidol, i kromatogrammet til tross for at det kun var mobilfase A som ble analysert. Da det ikke lyktes å bli kvitt disse utfordringene mens laboratoriearbeidet pågikk er kun resultatene for quetiapin gjengitt. LC-MS kromatogram for quetiapin fra DBS med konsentrasjon 100 ng/ml er vist i Figur 21. I kromatogrammet ser vi i tillegg til toppen for quetiapin, med retensjonstid 13,7, også en topp av ukjent opprinnelse med samme masseovergang, men med retensjonstid rundt 17,1 min. Hva denne toppen skyldes er ikke kjent, men signalet var også til stede i de blanke prøvene der det kun var analysert mobilfase. Linearitet, repeterbarhet, deteksjonsgrense (LOD) og kvantifiseringsgrense (LOQ) ble undersøkt. Det var ønske om å evaluere metoden for PALME på samme måte, men på grunn av begrenset tid ble dette ikke gjennomført.

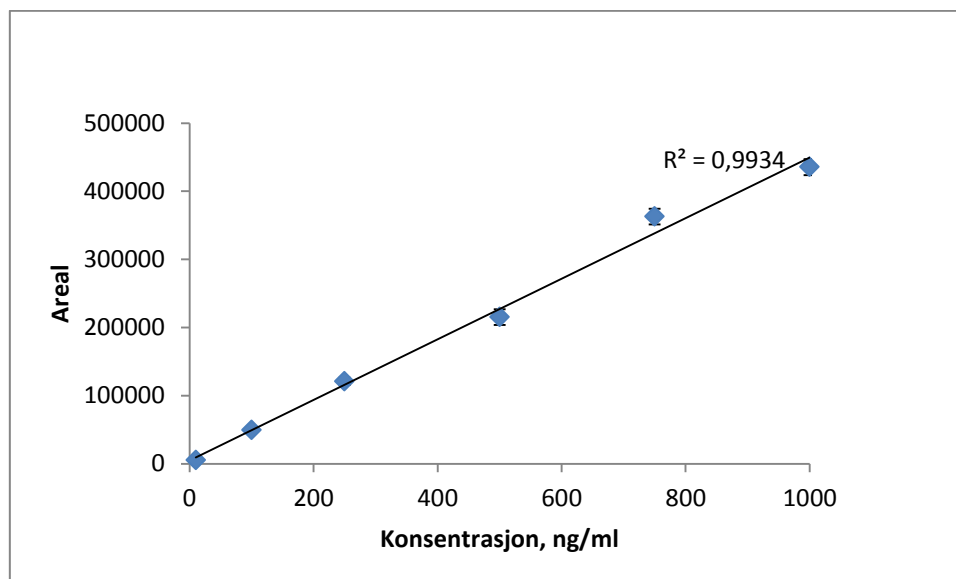


Figur 21: SRM-kromatogram fra LC-MS for quetiapin etter felling av oppløste DBS
Prøveløsning: 2 x 5 µl fullblod tilsatt quetiapin til 100 ng/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: 750 µl acetonitril; sentrifugerings hastighet: 13 000 rpm; reløsingvæske: 200 µl mobilfase A

4.6.1 Linearitet

Linearitet beskriver metodens evne til å gi standardkurver der forholdet mellom konsentrasjon og respons er lineært, innenfor et bestemt konsentrasjonsområde. Lineariteten bestemmes ved å gjøre lineær regresjon og bestemme regresjonskoeffisienten (r) [11].

Lineariteten ble bestemt for konsentrasjonsområdet 10-1000 ng/ml. Linearitetskurven til quetiapin er vist i Figur 22. Forholdet mellom konsentrasjon og respons var lineært for konsentrasjoner mellom 10-1000 ng/ml, med en korrelasjonskoeffisient (r^2) over 0,99.



Figur 22: Linearitetskurve for quetiapin

Prøveløsning: 2 x 5 µl fullblod tilsatt quetiapin til 10-1000 ng/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: 750 µl acetonitril; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm; reløsingvæske: 200 µl mobilfase A

4.6.2 Repeterbarhet

Repeaterbarhet beskriver spredningen i analyseresultatene ved gjentatte analyser under identiske betingelser, over et kort tidsrom. Repeterbarhet angis som relativt standardavvik (RSD) [11]. I dette arbeidet ble RSD beregnet for konsentrasjonene 10 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml og 1000 ng/ml. Resultatene er vist i Tabell 11. RSD lå under 15 % for alle de fire konsentrasjonene. Dette tilfredsstillende kravet i EMAs retningslinjer for bioanalytisk metodevalidering [38].

Tabell 11: RSD for quetiapin etter felling av oppløste DBS

Konsentrasjon (ng/ml)	10	100	500	1000
RSD (%)	14,7	7,1	5,4	2,7

Prøveløsning: 2 x 5 µl fullblod tilsatt quetiapin til 10-1000 ng/ml, tørket på CMC og oppløst i 500 µl 25 mM fosfatbuffer (pH 6,0); fellingsreagens: 750 µl acetonitril; sentrifugeringshastighet: 13 000 rpm; reløsingvæske: 200 µl mobilfase A

4.6.3 Deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense

Deteksjonsgrensen (LOD) er den laveste konsentrasjonen av analytt i prøven som kan detekteres med analysemetoden. LOD påvirkes av prøvens sammensetning, utbyttet av prøveopparbeidelsen og parametre ved selve analysen, som injeksjonsvolum, løsemiddel, hvor effektiv separasjonen er og detektorens egenskaper. I kromatografi kan LOD bestemmes som den konsentrasjonen som gir et bestemt signal-til-støy-forhold (S/N). Vanligvis defineres LOD som $S/N = 2$ eller 3 [11]. I dette arbeidet ble LOD definert som $S/N = 3$. Kvantifiseringsgrensen (LOQ) angir den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes i prøven. I kromatografi er LOQ vanligvis definert som $S/N = 10$ [11], som også ble brukt i dette arbeidet.

LOD og LOQ ble beregnet for quetiapin for alle de seks parallellene ved konsentrasjonen 100 ng/ml, og gjennomsnittet av disse beregningene ble bestemt. LOD ble beregnet til 0,8 ng/ml og LOQ 2,8 ng/ml. Dette ble sett på som tilfredsstillende i forhold til terapeutisk område for quetiapin som er $<1 \mu\text{g/ml}$ [30].

4.7 Veien videre

Det gjenstår fortsatt forsøk som hadde vært ønskelige å gjennomføre, men som det ikke ble tid til å gjøre i denne omgang. Dette innebærer evaluering av alle de fire modellanalyttene for både felling og PALME, da kun evaluering av felling med quetiapin ble gjennomført. Det bør undersøkes matrikseffekter ved analyse på LC-MS for å se om komponenter i ekstraktet påvirker ioniseringen av analyttene og dermed påvirker signalene i massespektrometeret. For PALME bør det undersøkes om CMC er til stede i ekstraktet. Det kunne også være interessant å se om det lar seg gjøre å løse opp DBS direkte i brønnene i donorplaten for PALME, slik at man forenkler oppløsningstrinnet i metoden. Det ville også være interessant å undersøke stabiliteten av DBS på CMC. I tidligere arbeid med DBS på de oppløselige polymerene alginat og kitosan har man sett at stabiliteten er tilfredsstillende ved oppbevaring både i romtemperatur, og ved $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ og $37 \text{ }^\circ\text{C}$ i 50 dager [9]. Dette gir grunn til å tro at også DBS med CMC som materiale er stabile ved lagring, men dette må undersøkes nærmere før man kan trekke noen konklusjon. I denne omgang lyktes det ikke å kombinere SPE og DBS.

Det ville vært interessant å se om man, ved å tilpasse metoden, kunne få denne kombinasjonen til å fungere.

5 Konklusjon

Bruk av *dried blood spots* (DBS) på den oppløselige polymeren karboksymetylcellulose (CMC) i kombinasjon med prøveopparbeidelsesmetodene fast-fase ekstraksjon (SPE), felling og *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME), er undersøkt. Fordelen med CMC som materiale for å avsette blodprøvene, er at de tørkede prøvene kan løses fullstendig opp før prøveopparbeidelsen.

Ved bruk av både PALME og felling med acetonitril som prøveopparbeidelsesmetoder ble det oppnådd høye utbytter med god repeterbarhet for alle de fire modellanalyttene. Ved felling med acetonitril ble også over 99 % av CMC fjernet i løpet av prøveopparbeidelsen. Metoden for felling viste god linearitet og en kvantifiseringsgrense i nanogramområdet for den undersøkte modellanalytten, ved bruk av LC-MS.

Bruk av DBS i kombinasjon med SPE viste seg å være vanskelig fordi blodet tettet kolonnen, samt førte til et skittent eluat. Det betyr i midlertid ikke at kombinasjonen er umulig, men det er behov for mer arbeid for å løse utfordringene. Forsøk med prøver uten blod viste høye utbytter og god repeterbarhet, og at tilstedeværelsen av CMC i den oppløste prøven ikke påvirket ekstraksjonsutbyttet. I tillegg ble CMC i stor grad fjernet fra prøven i løpet av ekstraksjonen.

Dette arbeidet har vist at DBS på oppløselige polymere enkelt kan kombineres med felling og PALME. Forhåpentligvis vil dette kunne øke interessen rundt bruk av oppløselige polymere som materiale for DBS.

Litteraturliste

1. Meesters, R.J. and G.P. Hooff, *State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends*. *Bioanalysis*, 2013. **5**(17): p. 2187-2208.
2. Guthrie, R. and A. Susi, *A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants*. *Pediatrics*, 1963. **32**(3): p. 338-43.
3. Li, W. and F.L.S. Tse, *Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules*. *Biomedical chromatography*, 2010. **24**(1): p. 49-65.
4. Henion, J., R.V. Oliveira, and D.H. Chace, *Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities*. *Bioanalysis*, 2013. **5**(20): p. 2547-2565.
5. Parker, S.P. and W.D. Cubitt, *The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies*. *Journal of Clinical Pathology*, 1999. **52**(9): p. 633-9.
6. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) and paediatric committee (PDCO). *Guideline on the investigation of medicinal products in the term and preterm neonate*. 2009 [cited 2014 23.04]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003750.pdf.
7. Edelbroek, P., J. van der Heijden, and L.M.L. Stolk, *Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls*. *Therapeutic drug monitoring*, 2009. **31**(3): p. 327-36.
8. Mei, J.V., J.R. Alexander, B.W. Adam, and W.H. Hannon, *Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens*. *The Journal of nutrition*, 2001. **131**(5): p. 1631-6S.
9. Eibak, L.E.E., A. Hegge, K. Rasmussen, S. Pedersen Bjergaard, and A. Gjelstad, *Alginate and chitosan foam combined with electromembrane extraction for dried blood spot analysis*. *Analytical chemistry*, 2012. **84**(20): p. 8783-9.
10. Ashri, N. and M. Abdel Rehim, *Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices*. *Bioanalysis*, 2011. **3**(17): p. 2003-18.
11. Pedersen Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2 ed. 2010, Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS. 505.
12. Gjelstad, A., K. Gjelstad, M. Rasmussen, S. Parmer, and B. Pedersen, *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. *Bioanalysis*, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
13. Lødøen, C., L.E. Eng Eibak, K. Rasmussen, S. Pedersen Bjergaard, T. Andersen, and A. Gjelstad, *Storage of oral fluid as dried spots on alginate and chitosan foam - a new concept for oral fluid collection*. *Bioanalysis*, 2013. **5**(3): p. 317-25.
14. GE Healthcare. *FTA DMPK cards - Dried blood spot microvolume sampling*. [cited 2014 18.03]; Available from: <https://promo.gelifesciences.com/na/k11286/fta.asp>.
15. Samuelsson, G. and L. Bohlin, *Drugs of natural origin: A treatise of pharmacognosy*. 6 ed. 2009, Kristianstad, Sweden: Apotekarsocieteten.
16. Klemm, D., B. Heublein, H.-P. Fink, and A. Bohn, *Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material*. *Angewandte Chemie (International ed.)*, 2005. **44**(22): p. 3358-3393.
17. Waring, M.J. and D. Parsons, *Physico-chemical characterisation of carboxymethylated spun cellulose fibres*. *Biomaterials*, 2001. **22**(9): p. 903-912.
18. Chang, M., Q. Ji, J. Zhang, and T. El Shourbagy, *Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons*. *Drug development research*, 2007. **68**(3): p. 107-133.

19. Hennion, M.-C., *Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **856**(1): p. 3-54.
20. McDowall, R., *Sample preparation for biomedical analysis*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1989. **492**: p. 3-58.
21. Englard, S. and S. Seifter, [22] *Precipitation techniques*, i *Methods in Enzymology*, P.D. Murray, Editor. 1990, Academic Press. p. 285-300.
22. 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. 2650-6.
23. Ermer, J. and M. Vogel, *Applications of hyphenated LC-MS techniques in pharmaceutical analysis*. Biomedical chromatography, 2000. **14**(6): p. 373-83.
24. Lim, C.K., *Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002. **25**(5): p. 547.
25. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 2005. **24**(1): p. 1-29.
26. Schwartz, J., J.E.P. Syka, and M. Senko, *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-69.
27. Lemière, F., *Mass analysers for LC-MS*. Guide to LC-MS, LC-GC Europe, 2001: p. 22-28.
28. ChemAxon. [cited 2014 27.03]; Available from: <http://www.chemicalize.org/>.
29. Fjeldstad, T., ed. *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell 2013*. 2013, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen.
30. Schulz, M. and A. Schmoltdt, *Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics*. Die Pharmazie, 2003. **58**(7): p. 447-74.
31. ConvaTec. *Aquacel Hydrofiber bandasje*. 2014 [cited 2014 25.04]; Available from: http://www.convatec.no/Produkt/saringr/aquacel-hydrofiber-bandasje/p-a38c738a-5562-499a-9f84-eef7612cc0e8/2_0033/.
32. Waters. *Oasis sample preparation: Application notebook*. 2008 [cited 2014 11.04]; Available from: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000609en.pdf>.
33. DuBois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith, *Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances*. Analytical chemistry, 1956. **28**(3): p. 350-356.
34. Smith & Nephew. *Durafiber*. 2014 [cited 2014 25.04]; Available from: <http://www.smith-nephew.com/professional/products/featured-products/durafiber/>.
35. Hercules, *Aqualon - Sodium carboxymethylcellulose: Physical and chemical properties*. 1999, Wilmington, USA: Hercules Incorporated.
36. Taylor, R.R., K.L. Hoffman, B. Schniedewind, C. Clavijo, J.L. Galinkin, and U. Christians, *Comparison of the quantification of acetaminophen in plasma, cerebrospinal fluid and dried blood spots using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013. **83**: p. 1-9.
37. Pedersen Bjergaard, S., T. Ho, and K. Rasmussen, *Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs*. Journal of separation science, 2002. **25**(3): p. 141-146.
38. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011 [cited 2014 31.04]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.