

Utvikling og optimering av et
elektromembranekstraksjonssystem
direkte koblet til massespektrometri for
in vitro metabolske forsøk

*Et system for online monitorering av in vitro
legemiddelmetabolisme*

Anne Marit Morvik



Masteroppgave i legemiddelanalyse

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2014

Utvikling og optimering av et elektromembranekstraksjonssystem direkte koblet til massespektrometri for in vitro metabolske forsøk

Masteroppgave ved Faggruppen for Legemiddelanalyse

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,

Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

Det praktiske labarbeidet ble gjennomført ved

Institut for Farmaci og Analytisk Kemi,

Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Univeristet

Veiledere:

Professor Stig Pedersen-Bjergaard

Lektor Nickolaj Jacob Petersen

Lektor Charlotte Gabel-Jensen

Professor Steen Honoré Hansen

Lektor Henrik Jensen

© Forfatter Anne Marit Morvik

År 2014

Tittel ”Utvikling og optimering av et elektromembranekstraksjonssystem direkte koblet til massespektrometri for in vitro metabolske forsøk”

Forfatter Anne Marit Morvik

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

Sammendrag

EME (elektromembranekstraksjon) er en prøveopparbeidelsesmetode som baserer seg på å ekstrahere stoffer over en kunstig væskemembran. Ekstraksjonen er drevet av et spenningsfelt som er lagt over væskemembranen. Metoden gir rene og oppkonsentrerte ekstrakter og ulike analytter har blitt ekstrahert fra ulike prøveløsninger, inkludert forskjellige biologiske prøver og vannprøver. Det har også blitt forsøkt å monitorere in vitro legemiddelmetabolisme ved å koble EME-systemer direkte til MS. I dette arbeidet ble et nytt EME-oppsett optimert og det ble forsøkt å monitorere noen utvalgte legemidlers in vitro metabolisme ved bruk av levermikrosomer ved å koble EME-systemet direkte til MS. Systemet hadde en 2 cm lang kunstig væskemembran som ble laget ved å impregnere en porøs hullfiber med NPOE. Både donorløsningen og akseptorløsningen var i bevegelse og dette systemet hadde derfor noen fordeler i forhold til tidligere EME-systemer som har blitt prøvd ut til å monitorere in vitro legemiddelmetabolisme.

De utvalgte legemidlenes halveringstider ved in vitro metabolisme ble beregnet ut fra konsentrasjonsprofilene basert på data fra EME-ESI-MS. Amitriptylin hadde halveringstid på 2,8 min ved bruk av rottelevermikrosomer og 105,3 min ved bruk av humane levermikrosomer. Det ble tatt ut prøver underveis i metabolismen som ble analysert på tradisjonell måte med prøveopparbeidelse og LC-MS. Halveringstidene for amitriptylin beregnet basert på LC-MS-analyse var 2,0 min med rottelevermikrosomer og 66,6 min ved humane mikrosomer. De fire andre legemidlene ble metabolisert in vitro ved bruk av rottelevermikrosomer og halveringstidene ble beregnet basert på konsentrasjonsprofilene fra EME-ESI-MS. Haloperidol hadde halveringstid på 13,9 min, metadon på 20,8 min, loperamid på 9,6 min og prometazin på 4,8 min. Det ble observert en forsinkelse i ekstraksjonen av analytter over den relativt tykke væskemembranen. Videre utvikling innebærer videreføring av dobbeltflowsystemet og en tynnere væskemembran for å oppnå et mer realistisk bilde av metabolismen.

Forord

Takk til hovedveilederen min Stig Pedersen-Bjergaard for raske og konkrete tilbakemeldinger og god veiledning gjennom hele oppgaven.

Takk til Nickolaj Jacob Petersen for god veiledning på lab og at du la mye tid og energi i prosjektet. Takk til Charlotte Gabel-Jensen for hjelp med de metabolske forsøkene. Takk til Henrik Jensen og Steen Honorè Hansen for råd og tips underveis.

Takk Mamma, for korrekturlesing.

Takk til farmasipraksisforeningå for moralsk støtte gjennom hele studiet og besøk i København.

Takk til Ingvild Ringheim og Elina Tayyar for et fantastisk studieopphold i København.

Takk til Team immigrants//Chubbi og Lejon!

Takk til Juicy og Den Rosa Hunden for moralsk støtte.

Anne Marit Morvik

Oslo 15.05.14

Forkortelser

µg	mikrogram
µl	mikroliter
µM	mikromolar
µm	mikrometer
Amu	atommasseenhet
CE	kapillærelektroforese
cm	centimeter
CYP	cytochrom P450
EDDP	etyl-dimetyl-difenyl-pyrrolinium
EF	oppkonsentreringsfaktor
EMDP	etyl- metyl-difenyl-pyrrolin
EME	elektromembranekstraksjon
ESI	elektrosprayionisasjon
EOF	elektroosmotisk flow
FMO	falvin-monooksygenaser
GC	gasskromatografi
GST	glutathion-S-transferase
HF	hullfiber
HLM	humane levermikrosomer
HPLC	væskeskromatografi

i.d.	indre diameter
IS	intern standard
KH_2PO_4	kaliumdihydrogenfosfat
kV	kilovolt
L	liter
LC-MS	væskekromatografi med massespektrometri som deteksjon
LPME	væskefasemikroekstraksjon
m/z	masse/ladning
mg	milligram
MgCl_2	magnesiumklorid
min	minutter
ml	milliliter
ml/t	milliliter per time
mM	millimolar
mm	millimeter
ms	millisekund
MS	massespektrometri
NADPH	β -nikotinamid-adenin-dinkleotid-2-fosfat
NAT	n-acetyl-transferase
NPOE	2-nitrofenyloktyleter
o.d.	ytre diameter

R	utbytte
RLM	rottelevermikrosomer
SLM	kunstig væskemembran (supported liquid membrane)
ST	sulfotransferase
TOF	time of flight-masseanalysator
UGT	UDP -glukuronosyltransferase
UV	ultraviolet
V	volt

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon	3
2	Teori.....	6
2.1	CE.....	6
2.2	MS	7
2.3	Prinsipp EME	10
2.4	Teoretiske modeller for massetransport over væskemembranen	14
2.5	Metabolismestudier	16
2.6	Metabolisme og EME.....	18
3	Eksperiment.....	19
3.1	Modellanalytter	19
3.2	Løsninger.....	20
3.3	Kjemikalier.....	21
3.4	Ekstraksjonsbetingelser CE.....	22
3.5	EME med offline CE deteksjon for optimaliseringsforsøk	24
3.6	Analysebetingelser CE	25
3.7	Beregning av utbytte og oppkonsentrering	25
3.8	Ekstraksjonsbetingelser MS	26
3.9	Metabolisme direkte koblet til MS.....	28
3.10	Tradisjonell analysemetoder for in vitro metabolismestudier av legemidler (LC-MS).....	30
3.11	Beregning av halveringstid.....	31
4	Resultat og diskusjon	32
4.1	Optimering av systemet ved offline CE	32
4.1.1	Spenningsoptimering.....	33
4.1.2	Hastighet på donarløsningen	34
4.1.3	Membranlengde.....	37
4.1.4	Stabilitet over tid	38
4.1.5	Påvirker graden av fiberens transparens ekstraksjonsutbytte?	39

4.2 EME-systemet koblet til MS	40
4.2.1 Systemstabilitet over tid	41
4.2.2 Responstid	42
4.3 In vitro metabolismeforsøk	44
4.3.1 Amitriptylin	45
4.3.2 Metadon.....	48
4.3.3 Loperamid	50
4.3.4 Prometazin.....	52
4.3.5 Haloperidol.....	54
4.4 Resultatene fra EME-ESI-MS sammenlignet med tradisjonell LC-MS-metode	55
4.4.1 In vitro-metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer	56
4.4.2 In vitro- metabolisme av amitriptylin med humane levermikrosomer.....	64
5 Konklusjon.....	66
Litteraturliste.....	67

1 Introduksjon

Utviklingen av hullfiber væskefase-mikroekstraksjon (HF-LPME) begynte på 2000-tallet (1). Det var et ønske om å utvikle en rask prøveopparbeidelsesmetode med høy oppkonsentrering som ga rene ekstrakter, og som i tillegg hadde lavt forbruk av løsemidler. Basert på prinsipper fra fast-fase- og væske-væske-ekstraksjon ble det utviklet både to- og trefasesystemer hvor en porøs hullfiber impregnert med et organisk løsemiddel skilte fasene (2). Ved å plassere en organisk væske inni hullfiberen ble det dannet et to-fasesystem hvor den organiske fasen var akseptorfase og kompatibel med GC. For ytterligere å forbedre selektiviteten og minke løsemiddelforbruk ble tre-fasesystemer hvor både donorløsningen og akseptorløsningen var vandige utviklet. Den vandige akseptorfase er kompatibel med HPLC, CE og MS. Ved å bruke et mindre volum akseptorfase enn donorfase oppnås oppkonsentrering av de ekstraherte analyttene. Figur 1.1 viser en skisse av et to-fasesystem og et tre-fasesystem hvor organisk løsemiddel er tegnet inn som grått. Hullfiberen er strukturbæreren for den kunstige væskemembranen (supported liquid membrane (SLM)) som er dannet ved å immobilisere et organisk løsemiddel i porene til hullfiberen (1). Drivkraften bak ekstraksjonen i tre-fasesystemet er forskjellen i pH i akseptorfase inni hullfiberen og donorfasen utenfor hullfiberen. Dette fører til passiv diffusjon av stoffene over membranen (2). Ekstraksjonsutbyttet på 41-106 % med 45 minutters ekstraksjonstid er oppnådd (3). Vanlige ekstraksjonstider for HF-LPME er 20-60 min (4).



Figur 1.1: Skisse av 2-fase-HF-LPME og 3-fase-HF-LPME. Organisk løsemiddel er tegnet inn i grått (2).

Ekstraksjonshastigheten øker når det settes elektrisk spenning over membranen (5). Et spenningsfelt dannes over væskemembranen når en elektrode settes i donorfasen og en annen elektrode settes i akseptorfase. Teknikken kalles elektromembranekstraksjon (EME) og drivkraften for ekstraksjonen er spenningen som er satt over membranen. I tillegg til at

ekstraktene blir svært rene, er forbruket av løsemidler lavt, oppkonsentreringen er høy og prøveopparbeidelsen er rask. I et forsøk som sammenlignet HF-LPME med EME var ekstraksjonstiden for maksimalt ekstraksjonsutbytte 60 minutter for HF-LPME, og 15 minutter for EME (6). Elektromembranen er selektiv, og gjør at stoffer som er polare eller har samme ladning som elektroden i akseptorfasen ikke passerer membranen. Nøytrale hydrofobe stoffer vil fordele seg i væskemembranen (1) og partikulært materiale vil bli værende i prøveløsningen fordi membranen også fungerer som et fysisk filter (7). Kun molekyler med motsatt ladning av elektroden i akseptorfasen vil kunne migrere elektrokinetisk over membranen. Retning og styrke på det elektriske feltet vil påvirke hvilke stoffer som ekstraheres over. Ved å velge en sur løsning som akseptorløsning vil sure stoffer, polare stoffer og store molekyler, som for eksempel proteiner bli igjen i donorløsningen.

De tidligere systemene ble laget med tanke på prøveopparbeidelse av blant annet biologiske prøver, som ofte har lav konsentrasjon av analytt og inneholder mange interfererende matrixkomponenter. Høy oppkonsentrering og høy opprensing er derfor ønskelig. Ekstraksjon av basiske legemidler (8), sure legemidler (9) og peptider (10) har blitt gjort i EME-systemer. Flere forskjellige EME-systemer har blitt prøvd ut, blant annet chip-system (7,11), dråpe-til-dråpe-system (12) og en EME-probe (13). Prøvene det har blitt ekstrahert fra har blant annet vært urin, plasma, serum, fullblod, brystmelk (4, 5,14-20) og forskjellige vannprøver (18, 19, 21-27). EME har gitt rene og oppkonsentrerte ekstrakter fra alle disse ulike prøveløsningene.

Den siste EME-proben (13) og chip-systemet (7,11) ble direkte koblet til MS for å monitorere legemiddelmetabolisme online. Fordelen med dette er at man får et fullstendig bilde av metabolismen, til sammenligning med tradisjonelle metoder hvor man tar ut prøver ved bestemte tider som det må gjøres prøveopparbeidelse på før prøvene analyseres på LC-MS (28). Det langsiktige målet er å kunne utfordre disse metodene med en enkel kobling direkte til MS uten videre prøveopparbeidelse. Membranen i chipen var vanskelig å bytte ut og vedlikeholde fordi systemet var lukket (7,11). For å lage selve chipen trengtes det spesielt utstyr. Proben var et forsøk på å komme rundt dette med en åpen struktur og enkel utbytting av membranen (13). En annen forskjell mellom chipen og proben var at både chipens donorfase og akseptorfase var i bevegelse, mens donorfase i proben var stillestående. Siden proben hadde høy ekstraksjonseffektivitet ble nedgangen i konsentrasjonen av legemiddelet som ble studert en kombinasjon av metabolsk omdannelse og ekstraksjon av legemiddelet over til akseptorløsningen. For at ekstraksjonen ikke skulle påvirke totalkonsentrasjonen av

legemiddelet, og dermed metabolismekinetikken i nevneverdig grad, foregikk derfor ekstraksjonen under «myke» betingelser med svært korte væskemembraner (1-5 mm) og lave spenning (2,5 V). Dermed ble ekstraksjonseffektiviteten lavere slik at endring i konsentrasjonen av legemiddelet i prøveløsningen skyldes metabolisme av legemiddelet alene. Dette er nødvendig for å monitorere den faktiske metabolismen og dermed ha mulighet til å beregne en halveringstid.

For å beholde den høye ekstraksjonseffektiviteten og samtidig kunne beregne en halveringstid ble det i dette arbeidet utviklet et nytt oppsett hvor både donorfasen og akseptorfasen var i bevegelse. For å ha donorfase i bevegelse må væskemembranen være i et lukket rom og målet var å gjøre væskemembranen mer tilgjengelig og håndterlig enn den var i chipen. Det var også et poeng å gjøre det enkelt slik at systemet kan lages i andre laboratorier uten spesielt utstyr.

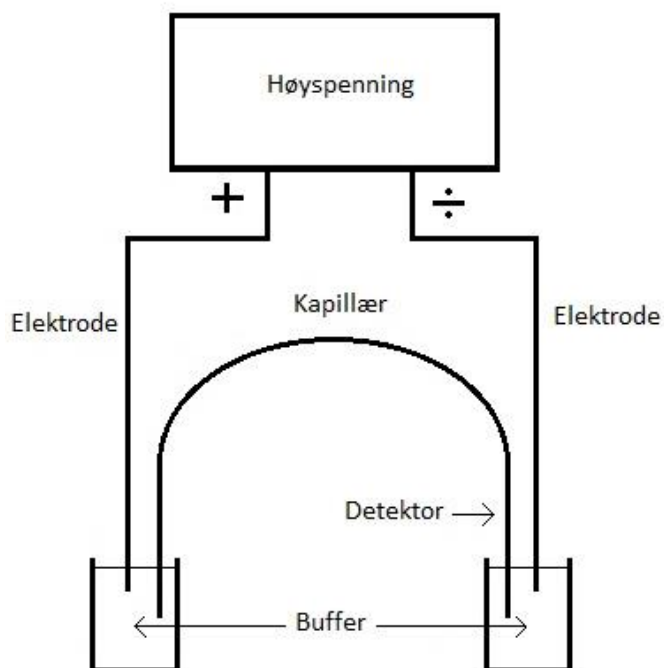
Systemet ble koblet direkte til MS og prøvd ut til å måle halveringstider og monitorere metabolitter i metabolismeforsøk på forskjellige legemidler. Målet med dette arbeidet er oppsummert i punktene under:

- konstruere et system med dobbeltflow og lett tilgjengelig membran som enkelt kan kopieres av andre
- optimere parameterne som påvirker ekstraksjonseffektiviteten
- koble systemet til MS via elektropray og få informasjon om systemets reproduserbarhet og stabilitet.
- undersøke om systemet kan brukes i metabolismestudier og sammenligne resultatene med resultater fra tradisjonelle metoder (LC-MS).

2 Teori

2.1 CE

I kapillærelektroforese (CE) separeres stoffer ved at de migrerer med forskjellig hastighet gjennom et kapillær, avhengig av hvilken ladning og størrelse de har. Avstanden stoffene skal migrere tilsvarer lengden av kapillæret som blir brukt (typisk 30-70 cm). I hver av endene av kapillæret er det en elektrode, og det settes høyspenning (typisk 10-30 kV) over kapillæret, som utgjør drivkraften for migreringen. Vanligvis er anoden ved starten av kapillæret og katoden ved enden av kapillæret, som vist i figur 2.1. Det er forholdet mellom ladning og størrelse på molekylene som bestemmer migrasjonshastigheten til stoffene. Små molekyler migrerer raskere enn store fordi de møter mindre motstand. Molekyler med høy grad av ladning migrerer raskere til elektroden med motsatt ladning. Stoffe som migrerer mot startenden av kapillæret trenger en annen drivkraft for å komme ut i den andre enden. Denne drivkraften kalles EOF (elektroosmotisk flow), som oppstår ved høy pH i mobilfasen og er et resultat av at det dannes et hydratisert kationisk motionlag ved kapillærveggen deprotonerte silikalag. Det basiske motionlaget vandrer mot kapillærenden, og siden motionlaget er hydratisert, fører det til at hele separasjonsbufferen vandrer mot kapillærenden. Nøytrale molekyler vil komme ut samtidig med EOF-fronten fordi de ikke migrerer, men følger EOF. Etter UV-deteksjon ved enden av kapillæret plottes et elektroferogram hvor signalstyrke for stoffene plottes som en funksjon av tid. CE brukes i kvantitative bestemmelser (29). I dette arbeidet ble CE valgt som analysemetode for å utføre optimaliseringsforsøk fordi CE er rask og enkel å håndtere.



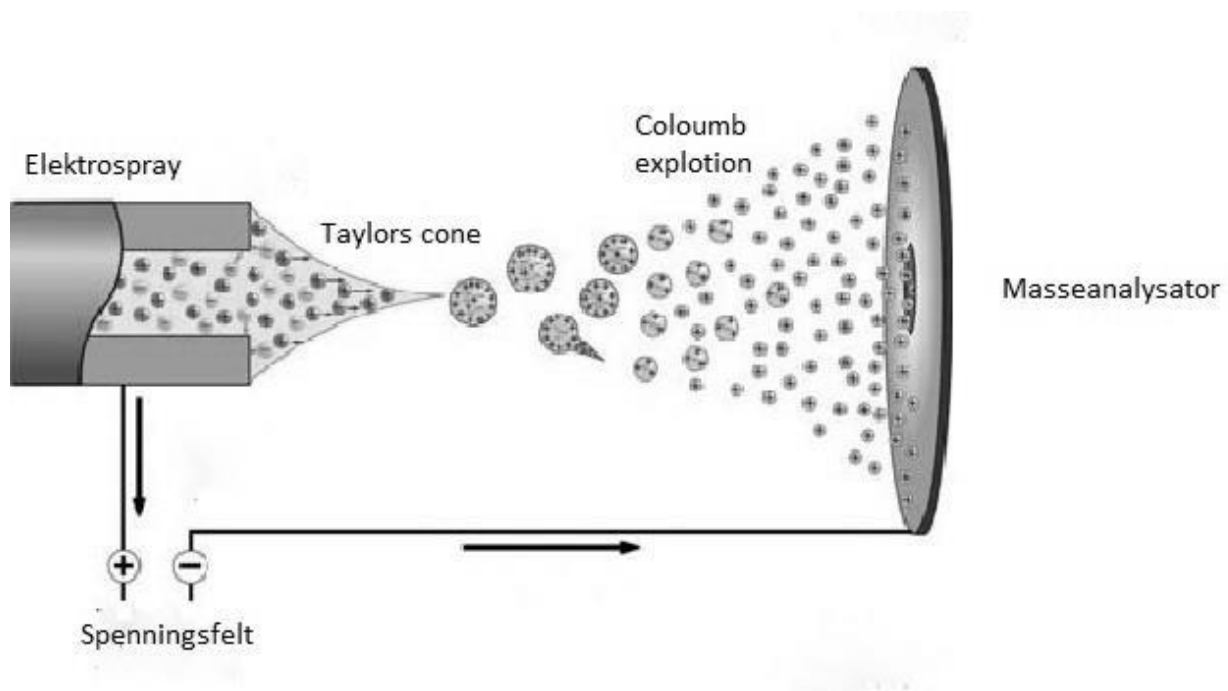
Figur 2.1: Prinsippskisse av CE.

2.2 MS

Massespektrometri (MS) er en analysemetode hvor molekylioner skilles ved forskjellig masse/ladning (m/z). Et molekylion med ladning +1 (z) og masse 200 (m) vil ha en m/z -verdi på 200. Stoffene ioniseres ved inngangen til analysatoren, og inni analysatoren vil de delvis fragmenteres og skilles på grunn av forskjellige m/z -verdier. Hvis analytter har forskjellig m/z -verdi trenger man derfor ikke å separere dem på forhånd med mindre de interferer med hverandre. LC-MS er mye brukt som analysemetode for biologiske prøver fordi væskekromatografien gir en separasjon av analytter og matrix før introduksjon av prøven til MS-instrumentet. Det finnes mange forskjellige typer MS-instrument som alle bygger på at molekylioner med ulik m/z -verdi vil ha forskjellig bane i et elektrisk eller magnetisk felt. Eksempler på moderne analysatorer som alle bruker elektriske felt er ionefeller, kvadrupol, time of flight (TOF) og orbitrap.

Før molekylioner kan analyseres i MS må de være ioniserte, og den ioniserte formen kalles molekylion. Som ionisasjonsteknikk ble elektrosprayionisering (ESI) brukt i dette arbeidet. Prinsippet for ESI er skissert i figur 2.2. Elektrosprayen danner en aerosol når en flyktig væske går gjennom kapillæret og forstøves ved utgangen av kapillæret. Utenfor kapillæret er

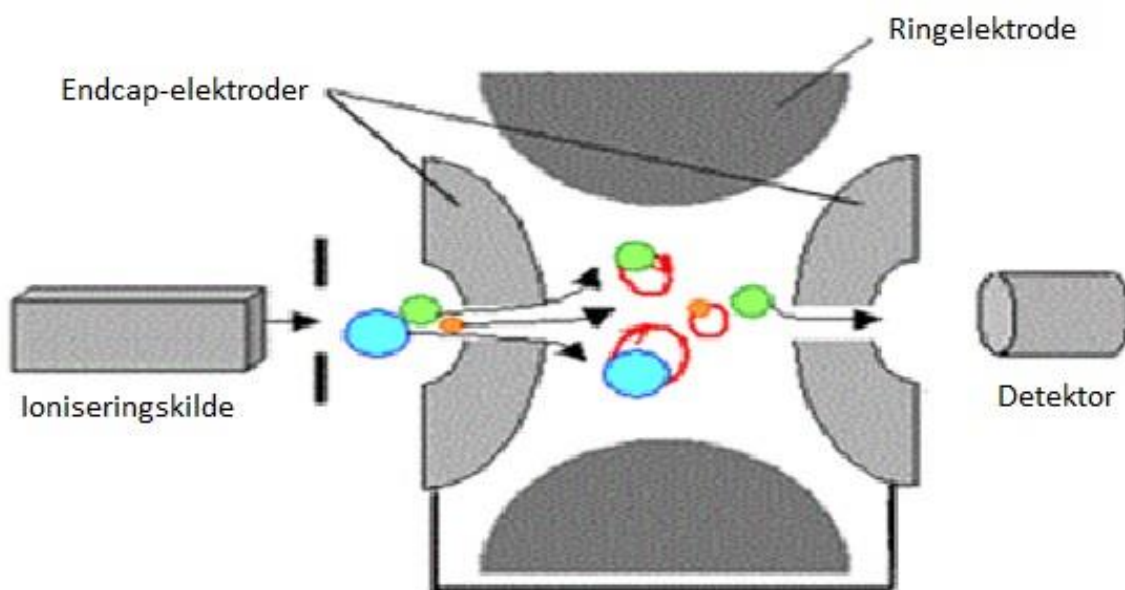
det en sylindrisk elektrode som har motsatt ladning av analytten(e) i den flyktige væsken. Det settes høyspenning (2-5 kV) over elektrodene for å få de ladede partiklene i aerosol-dråpene til å trekke ut mot overflaten av dråpene. En tørkegass (ofte nitrogen) får væsken i dråpene til å fordampe og fører den ut av instrumentet. Fordi dråpens volum krymper mens de ladde partiklene blir værende i dråpen blir de elektriske frastøtningkreftene i dråpen store, og dråpen deles i mange små dråper (coloumb explotion). De ladde partiklene trekkes mot den sylindriske elektroden og inn i MS. ESI omtales som en myk ioniseringsteknikk fordi den foregår under atmosfærisk trykk og danner få fragmentioner. Teknikken kan brukes på sure og basiske stoffer som er ionisert i væsken i elektrospøyen (29), og passer godt for polare, termisk labile og ikke-flyktige stoffer (30).



Figur 2.2: Prinsippkisse av elektrospøy (31).

Som analysator ble det i dette arbeidet brukt en ionefelle. Denne analysatoren har lav oppløsning og lang oppsamlingstid, men høy deteksjonssensivitet i full scan mode (32). Hensikten med studiene var å prøve ut og optimere det tekniske ved EME-systemet ved hjelp av allerede godt kjente substanser og ikke å utføre metabolismestudier i seg selv. Ionefellen var derfor en passende analysator til studiene.

En ionefelle består av to endcap-elektroder som er plassert på hver sin side av en ringelektrode, skissert i figur 2.3. En vekselstrømkilde brukes for å danne et spenningsfelt over ringelektroden med konstant frekvens og varierende amplitude. Endcap-elektroden er jordet. Ioner med m/z -verdi over en gitt verdi, som bestemmes av amplituden, fanges i ringelektroden. Når amplituden økes og frekvensen er uendret vil ioner med høyere og høyere m/z -verdi bli ustabile og slippes ut gjennom endcap-elektroden og detekteres (30).



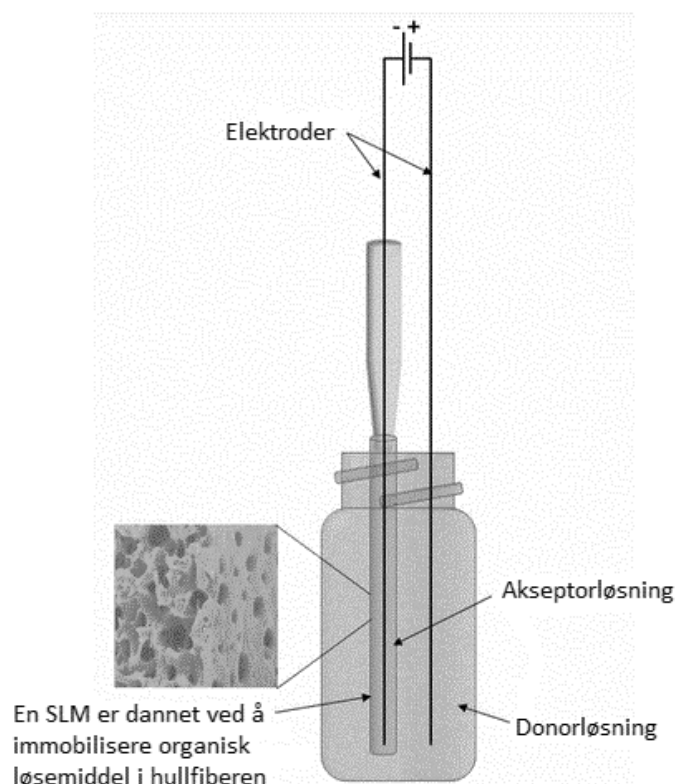
Figur 2.3: Prinsippkisse av ionefelle (33).

Ionefellen kan brukes til MS-MS hvis man legger på et spenningsfelt til, slik at kun ioner med bestemte m/z -verdier fanges i ringelektroden. Disse ionene kan så fragmenteres, og fragmentene kan i teorien fragmenteres videre i det uendelige (MS^n). Fase 1 metabolitter som har fått små grupper heftet på seg, vil lett miste denne gruppen under fragmentering. Massetap tilsvarende typiske grupper som blir satt på stoffene ved fase 1- metabolisme kan derfor indikere at stoffene er metabolitter. Fragmentering er også en nyttig funksjon for å identifisere ionene til å være det man tror de er; alle molekylioner fragmenterer på forskjellig måte og har dermed sitt særegne MS-fragment-spekter.

2.3 Prinsipp EME

Elektromembranekstraksjon (EME) er en type væske-væske-ekstraksjon hvor drivkraften til massetransporten mellom væskefasene er spenningen som er satt over membranen (5).

Teknikken er en videreutvikling av HF-LPME, hvor en kunstig, upolar væskemembran skiller to faser (2). Det organiske løsningsmiddelet som utgjør væskemembranen holdes på plass i en hullfibers porer (SLM) av kapillærkrefter. Ekstraksjon av stoffer i HF-LPME skjer ved at en likevekt bestemt av fordelingskoeffisientene til stoffene oppnås ved passiv diffusjon. Ved elektromembranekstraksjon (EME) har man satt spenning over et slikt system, og det ble gjort for første gang i 2006 (5). Figur 2.4 viser en prinsippskisse av et EME-system. I et tre-fase-system hvor akseptorløsningen og donorløsningen er vandige, utgjør væskemembranen en tredje, upolar fase. En prøveløsning med analytt vil utgjøre donorfasen, mens akseptorfasen utgjør ekstraktet som etter ekstraksjon analyseres i et analyseinstrument. Ved å plassere en elektrode på hver sin side av membranen; én i akseptorfase inne i hullfiberen og én i donorfasen som er på utsiden av hullfiberen, vil ioniserte stoffer ekstraheres over membranen. Kationer vil bli ekstrahert fra donorfasen ved å plassere katoden i akseptorfase, og anioner blir ekstrahert fra donorfasen ved å plassere anoden i akseptorløsningen (13).



Figur 2.4: Prinsippskisse av EME (34).

Spenninger fra 0V til 300V har blitt prøvd ut og det er enkelt å variere spenningen og retningen på det elektriske feltet ved å bruke en ekstern strømkilde (5). pH i donorløsningen viste seg i liten grad å påvirke ekstraksjonsutbyttet, selv når pH var nær pKa-verdien til stoffene. Dette antyder at massetransporten i prøveløsningen ikke er det hastighetsbestemmende trinnet i ekstraksjonen. pH i akseptorløsningen er derimot av stor betydning for ekstraksjonsutbyttet. Økt pH gir lavere ekstraksjonsutbytte for basiske stoffer grunnet deprotonering av stoffene i akseptorfasen og tilbakeekstraksjon til den organiske membranen.

Hvilket organisk løsemiddel som blir brukt til å danne væskemembranen påvirker ekstraksjonsutbyttet (5). Løsemidlene bør være ikke-flyktige, lite løselige i vann, ha høyt dipol-moment, være sterke protonakseptorer og svake protondonorer (35). En stabilt lav strøm gjennom membranen gir stabile ekstraksjonsbetingelser og rene ekstrakter. Løsemidler med lav molekylvekt og høy vannløselighet er uegnet til å lage en SLM fordi strømmen gjennom membranen da blir høy. Høy strøm gjennom væskemembranen fører til elektrolyse av akseptorløsning og donorløsning ved elektrodene. Dermed dannes gassbobler, noe som er ugunstig. Ved bruk av løsemidler med høy molekylvekt og lav løselighet i vann ble det ikke målt noen strøm gjennom membranen, og da skjer det ingen ekstraksjon. De stoffene som har vist seg å egne seg godt til å danne en effektiv SLM til EME har for det meste vært ketoner og nitroaromatiske forbindelser. I tillegg til 2-nitrofenyl-oktyl-eter (NPOE) har blant annet 1-isopropyl-4-nitrobenzene, 1-ethyl-2-nitrobenzene, 2-nitrophenyl pentyl (17), 2-nitrotoluene and 2,4-dimethyl-1-nitrobenzene, 2-oktone, 2-decanone, 2,6-dimetyl-4-heptanone, 2-nonanone og 6-undecanone vist seg å være gode løsemidler å lage væskemembraner til EME med. NPOE har vist seg å gi høye ekstraksjonsutbytter for flere stoffer (35) og det dannes lite gassbobler (5).

Det elektriske feltet øker distribusjonskoeffisientene til analyttene slik at analyttene blir transportert inn i den upolare væskemembranen selv om de er protonerte (36). Etter distribusjon inn i membranen er drivkraften for massetransporten gjennom væskemembranen først og fremst elektrokinetisk, men også passiv diffusjon bidrar til massetransporten. Analyttene forblir delvis protonert i membranen, og noen analytter mister mer av ladningen sin enn andre. Disse analyttene vil bruke lenger tid gjennom membranen fordi

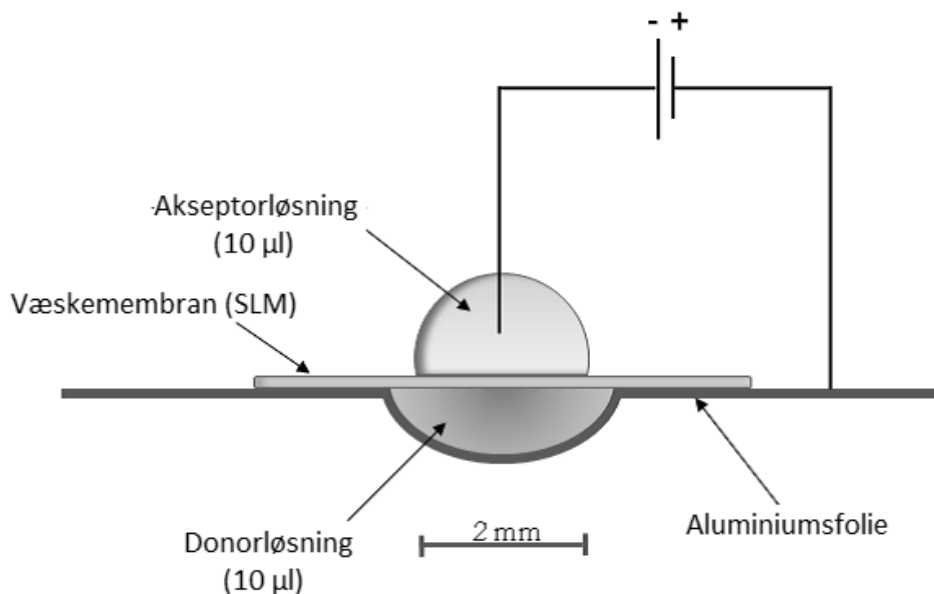
massetransporten for nøytrale molekyler skjer ved passiv diffusjon, som er tregere enn elektrokinetisk migrasjon (36).

EME gir ofte rene ekstrakter fordi væskemembranen er svært selektiv (5).

Matrixkomponenter fra biologiske prøver passerer i liten grad membranen. Man kan som tidligere nevnt påvirke hvilke stoffer som migrerer til akseptorfase ved hjelp av pH i akseptorfase, spenningen over membranen og hvilket organisk løsemiddel man bruker til å danne membranen. Ved lav spenning vil upolare analytter med liten ladning passere, mens høyere spenning skaper en sterkere drivkraft for ekstraksjon av mer polare stoffer med flere ladninger (37). Polare stoffer blir i liten grad ekstrahert over membranen når spenningen er lav. Høy oppkonsentrering kan oppnås ved å ha et større volum donorfase enn akseptorfase.

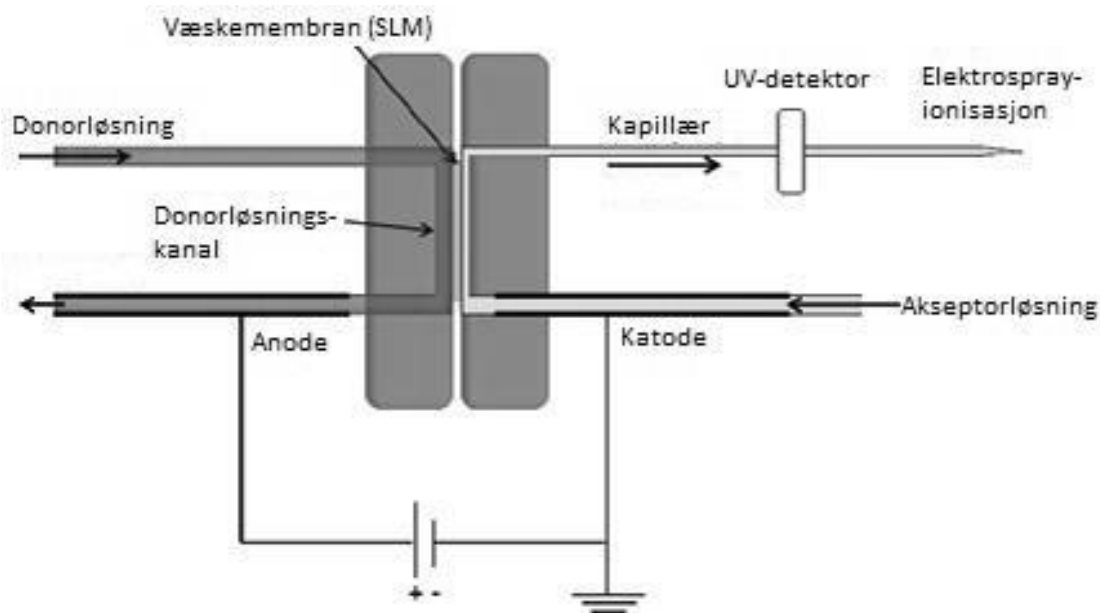
EME har vist seg å kunne gi rene ekstrakter fra forskjellige prøveløsninger. Ulike typer stoffer er blitt ekstrahert fra ulike typer prøver. Fra fullblod, plasma, serum, brystmelk og urin er sure (9,19) og basiske legemidler (4,5,8,16-18) blitt ekstrahert over i akseptorløsning. Aminosyrer har blitt ekstrahert fra serum, plasma og fullblod (14) og peptider har blitt ekstrahert fra sur løsning (10). Metaller, legemidler og miljøgifter har blitt ekstrahert fra forskjellige vandige prøver; både ferskvann (18,19,21-26) og saltvann (27).

Ulike EME-systemer har blitt prøvd ut. Blant annet har chip-system (11), dråpe-til dråpe-system (12), en EME-probe (13) og systemer med stillestående faser (16), som vist i figur 2.4 blitt prøvd ut i forskjellige typer forsøk. En prinsippsskisse av dråpe-til-dråpe-systemet er vist i figur 2.5. Både donor- og akseptordråpen er vandig. Etter 5 minutters ekstraksjon av basiske legemidler ble utbyttet på 33-47 % oppnådd (12). Systemet viste seg å være noe ustabil og lite reproducerbart.



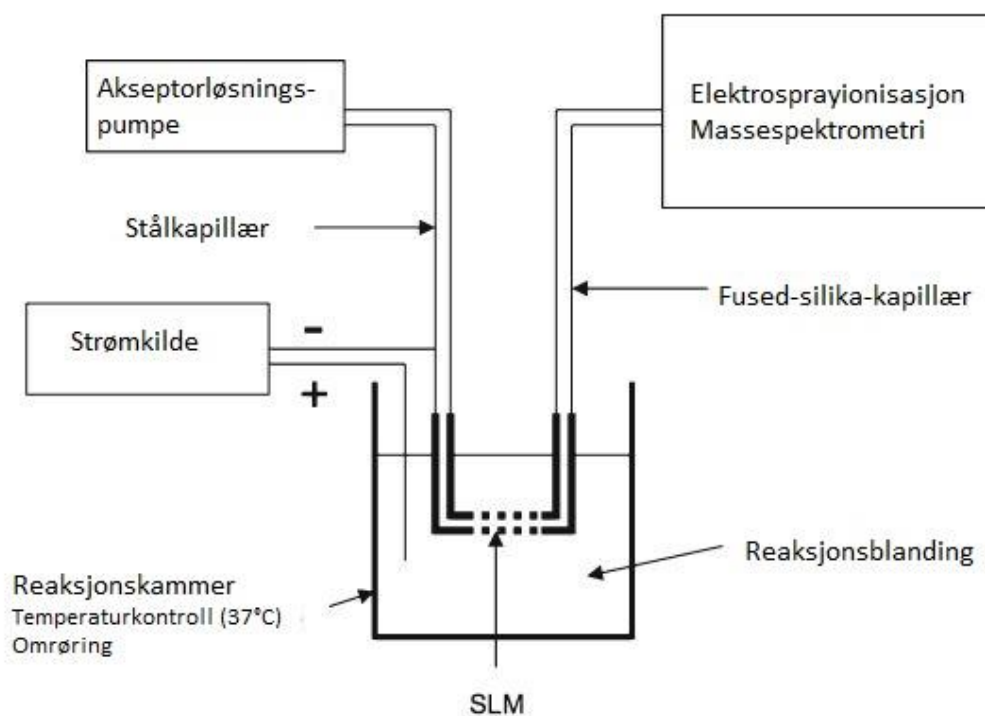
Figur 2-5: Prinsskisse av dråpe-til-dråpe-systemet (34).

I EME-chip-systemet var både donorløsningen og akseptorløsningen i bevegelse, som vist i figur 2.6. Basiske legemidler ble ekstrahert fra sur løsning med utbytter på 20-60 % (7). Systemet var stabilt, og membranen var limt inne mellom to pleksiglassplater. Dette gjorde imidlertid systemet litt vanskeligere å håndtere.



Figur 2.6: Prinsskisse av chip-systemet som ble bruk til metabolismeforsøk (34).

EME-proben som er skissert i figur 2.7 er et åpent system hvor SLM dyppes ned i prøveløsningen. Her er akseptorfasen i bevegelse, mens prøveløsningen er stillestående. Membranen er lett å lage og vedlikeholde og systemet er enkelt å sette opp. Probens høye ekstraksjonseffektivitet gjorde at kinetikken til de metabolske reaksjonene ved in vitro metabolisme av legemidler ble påvirket. Dermed var halveringstidene som ble målt var en kombinasjon av metabolsk aktivitet og ekstraksjon av legemiddelet ut av reaksjonskammeret. Ekstraksjonsbetingelser ble derfor valgt slik at ekstraksjonseffektiviteten skulle være lav. Både chip-systemet og proben har blitt brukt til in vitro metabolismeforsøk (11,13).



Figur 2.7 Prinsskisse av EME-proben som ble brukt til metabolismeforsøk (13).

2.4 Teoretiske modeller for massetransport over væskemembranen

En modifisert Nernst-Planck-likning kan brukes til å beskrive flux over væskemembranen matematisk (38). Faktorer i likningen som påvirker analyttens flux over væskemembranen er spenning, ionebalanse og temperatur. Økt spenning og lav ionebalanse, definert som

ionekonsentrasjon i donorløsningen delt på ionekonsentrasjonen i akseptorløsningen, gir økt flux. Temperaturen påvirker analyttens flux i et mer komplisert mønster.

En annen og nyere teoretisk modell beskriver hvordan EME-systemet er et distribusjonssystem med en elektroforetisk komponent (den elektrokinetiske migrasjonen) (36). Forskjellen fra LPME, som er et rent distribusjonssystem hvor analyttene fordeler seg passivt i fasene, er at distribusjonskoeffisientene i EME er spenningsavhengige. I tillegg fører det elektriske feltet til elektrokinetisk migrasjon, slik at EME også har en elektroforetisk komponent.

Ledningsevnen er større i de vandige akseptor- og donorfasene enn i den organiske væskemembranen og det elektriske feltet blir derfor sterkt over væskemembranen. Det sterke feltet gjør at distribusjonen fra donorfasen og inn i væskemembranen er høy slik at analyttene kan transporteres inn i membranen selv om de er ladd. I tillegg fører den høye spenningen til økt massetransport over membranen ved elektrokinetisk migrasjon. Analyttens distribusjonskoeffisienter er som nevnt spenningsavhengige, i tillegg til at de blir påvirket av volumet av donor- og akseptorløsningen og væskemembranen, membranoverflaten og permeabilitetskoeffisientene. Det hastighetsbestemmende trinnet i ekstraksjonen er transporten av analyttene gjennom væskemembranen, bestemt av permeabilitetskoeffisientene. Forsinkelsen i ekstraksjonen er bestemt av analyttens oppholdstid i væskemembranen.

De tidsavhengige konsentrasjonene i donorløsningen ($C_{Di}(t)$), væskemembranen ($C_{mi}(t)$) og akseptorløsningen ($C_{Ai}(t)$) beskrives av henholdsvis likning 1, 2 og 3. A_f er det aktive overflatearealet av væskemembranen. $P_i^{D \rightarrow A}$ er permeabilitetskoeffisienten fra donorløsningen til akseptorløsningen, som blant annet er avhengig av spenningen og væskemembranens tykkelse. k_d^* er analyttens distribusjonskoeffisient. V_D er volumet av donorløsningen, C_{Di}^0 er startkonsentrasjonen i donorløsningen, V_A er volumet av akseptorløsningen og V_m er volumet av væskemembranen.

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

Likning 1: Konsentrasjon av legemiddel i donorløsningen ved tiden t.

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

Likning 2: Konsentrasjon av legemiddel i væskemembranen ved tiden t.

$$C_{Ai}(t) = \frac{V_D C_{Di}^0 - C_{Di}(t)(V_D + k_a^* * V_m)}{V_A}$$

Likning 3: Konsentrasjon av legemiddel i akseptorfasen ved tiden t.

Utfra likningene 1,2 og 3 ser man at ekstraksjonsutbyttet i EME bestemmes av volumet av donor- og akseptorfasene og væskemembranen, permeabilitetskoeffisienten, distribusjonskoeffisienten og overflatearealet av membranen.

2.5 Metabolismestudier

Legemidler og andre eksogene stoffer metaboliseres av flere organer, blant annet lever, magesekk og tarm (39). Hensikten med denne biotransformasjonen er å gjøre molekylene mer polare slik at de lettere kan skilles ut av nyrene. Metaboliseringsreaksjonene deles i to grupper; fase 1-reaksjoner og fase 2-reaksjoner. Enzymene som hører til superfamilien cytochrom P450 (CYP) og flavin-monooksygenaser (FMO) står i stor grad for fase-1 metabolismen (32), og de mest fremtredende enzymene i fase-2-metabolismen er UDP-glukuronyltransferase (UGT) og N-acetyltransferase (NAT) (40). Ved fase 1-metabolisme skjer en oksidering, redusering eller hydrolysering som gjør molekylene mer hydrofile (39). Fase-1-metabolitter kan være hydrofile nok til å skilles ut som de er, eller så kan fase-1-enzymene ha dannet reaktive områder på molekylet som fase 2-enzymene kan bruke (32).

Metaboliseringsfase 2 kalles konjugeringsfasen og her blir en større, hydrofil gruppe satt på molekylet (40). Dette er for eksempel glukuronsyre (som utføres av UGT-enzymet), acetylgrupper (som utføres av NAT-enzymet) sulfater (som utføres av ST-enzymene), aminosyrer, glutation (som utføres av GST-enzymene) eller metylgrupper. Fase-2 reaksjoner fører som regel til at det dannes inaktive metabolitter (39). Et legemiddelmolekyl kan gjennomgå både fase-1 og fase-2-metabolisme, ingen av dem eller kun 1 av dem.

Under metabolisme av legemidler dannes det ikke bare inaktive metabolitter som skilles lettere ut. Det dannes også aktive metabolitter, som både kan være mer eller mindre aktive

enn modersubstansen (39). Dette utnyttes i noen legemiddelformuleringer. Metabolittene kan også være toksiske og informasjon om biotransformasjon av en legemiddelkandidat under utvikling kan blant annet brukes til å forutse bivirkninger og til å vurdere sikkerheten ved eventuell bruk av legemiddelkandidaten. Hvis to eller flere legemidler har felles eller delvis felles metabolismevei er det fare for interaksjoner mellom legemidlene grunnet hemming eller induksjon av enzymene som metaboliserer legemidlene (41). Det er flere faktorer som spiller inn på hvordan en pasient blir påvirket av en slik interaksjon.

Metabolismestudier utføres blant annet som en del av utvikling av legemidler, og skjer in vitro i tidlige faser av utviklingen (41). I tillegg til at dyreliv spares på å gjøre det in vitro er det raskere og billigere enn in vivo-studier (42). For å utføre in vitro-studier trenger man enzymer. Disse kan komme i form av hepatocytter, mikrosomer eller rekombinante enzymer (41,43). Humane hepatocytter eller mikrosomer vil naturligvis gi resultat som ligner mest på det som kan forventes i en menneskekropp, men også enzymer fra andre arter (for eksempel rotte og hund) kan brukes til å utføre studier (41). Hepatocytter er intakte leverceller som inneholder både fase 1, fase 2-enzymmer og kofaktor (41). Levermikrosomer er subcellulære fraksjoner av leverceller som lages ved ultrasentrifugering og er den mest brukte kilden til enzymer i in vitro studier. Mikrosomene inneholder fase 1- enzymmer og kofaktor (for eksempel NADPH) må tilsettes for at enzymene skal kunne katalysere metabolske reaksjoner (28).

LC-MS-analyse brukes både til detektering og screening av metabolitter (39,44). Det vanligste er å bruke HPLC med reversfase-kolonne og gradienteluering og MS i full scan mode. Hvis molekyler har massetap/addisjon tilsvarende typiske grupper som blir fjernet eller addert ved metabolisme er dette en indikasjon på at det kan være metabolitter (43). TOF er et godt valg av analysator ved detektering fordi den har høy oppløsning og høy deteksjonssensitivitet (32). For identifisering brukes som regel tandem MS (MS-MS) (45). Fragmentmønstrene er strukturspesifikke og kan lokalisere biotransformasjoner i molekylet. Trippel kvadrupol eller kvadrupol-TOF/ionefelle kan brukes. Hvis metabolitter ikke kan detekteres med m/z -verdi alene, kan legemiddelet som skal metaboliseres radiomerkes (39).

Ved tradisjonelle metabolismestudier inkuberes det aktuelle legemiddelet sammen med mikrosomer og kofaktor i 90 minutter (28) på vannbad som er 37 °C. Prøver tas ut ved gitte tider, gjerne hvert femte minutt i starten og deretter mindre hyppig. Selv om prøvene fra disse forsøkene er enklere enn en fysiologisk prøve er det likevel en del matrixkomponenter

(proteiner, salter, og andre endogene stoffer) som kan blokkere HPLC-kolonner og kapillærer og interferere med signalene til analyttene (39). Det gjøres derfor en prøveopparbeidelse som består av å felle ut proteinene (enzymene) med syre eller organisk løsningsmiddel (for eksempel acetonitrill) og sentrifugering. Dette gjøres både for å stanse metabolismereaksjonene og for å fjerne proteiner (43). Prøven sentrifugeres og supernatanten filtreres før stoffene analyseres med LC-MS (32).

2.6 Metabolisme og EME

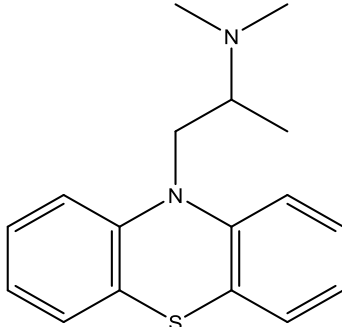
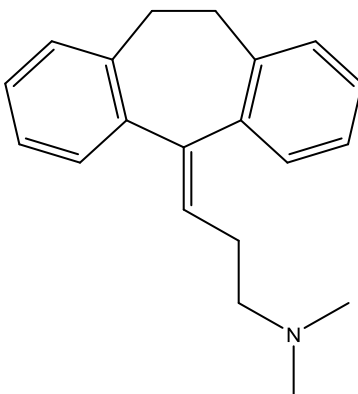
Ved å koble EME direkte til MS får man et online-bilde av hva som blir ekstrahert over væskemembranen. Dette er interessant hvis prøveløsningen i seg selv endres over tid, for eksempel ved in vitro studie av metabolisme av et legemiddel. Ved tradisjonelle metabolismestudier tas prøver ut ved gitte tider underveis i den metabolske reaksjonen og disse prøvene må man opparbeide med proteinfelling og sentrifugering før analyse på LC-MS. Fra disse prøvene får man informasjon om konsentrasjonene til legemiddelet og metabolittene ved de tidene prøvene er tatt ut. Det vil si at man kan gå glipp av informasjon om kortvarige variasjoner i konsentrasjoner mellom to prøvetakinger, kortlivede metabolitter (46) og informasjon om hvilke metabolitter som dannes først. Ved å koble metabolismekammeret direkte til EME-systemet får man en kontinuerlig ekstraksjon av det som befinner seg i metabolismekammeret. Væskemembranen i EME-systemet er selektiv slik at kun analytter med motsatt ladning av elektroden i akseptorløsningen ekstraheres fra prøveløsningen til akseptorløsningen, og proteiner og salter som ellers vil blokkere analyseinstrumentene og gi ionsuppresjon av analyttene ekstraheres ikke over væskemembranen. Kapillæret i EME-systemet kan derfor kobles direkte til MS via en elektropray uten videre prøveopparbeidelse og man får dermed et online-bilde av hva som skjer i reaksjonskammeret. Informasjonen vil dermed være mer utfyllende enn ved prøveuttak ved gitte tider slik det gjøres i tradisjonelle metabolismeforsøk. En ulempe sammenlignet med tradisjonelt oppsett er at det ikke gjøres noen separasjon, slik at metabolitter med samme masse og med forskjellig struktur vil inngå i samme signal ved online MS. Dette kan for eksempel være metabolitter som er strukturisomere, hvor for eksempel hydroksylering har skjedd på forskjellige steder på legemiddelmolekylet. Disse stoffene kan separeres med væskrokromatografi, og dermed komme inn i MS ved forskjellige tider i tradisjonelt oppsett.

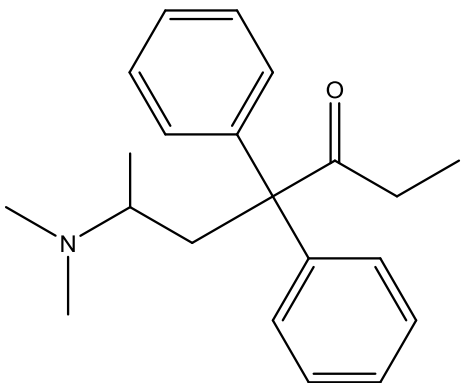
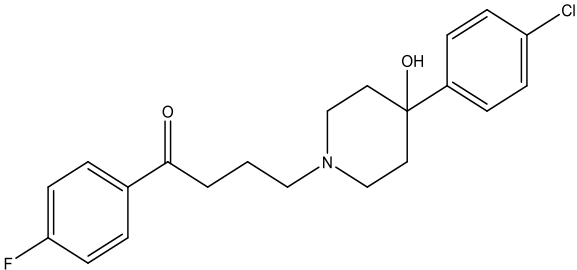
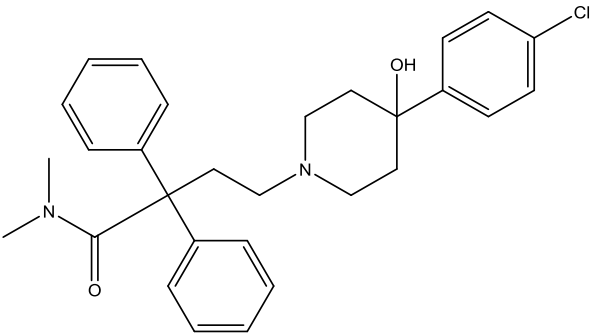
3 Eksperiment

3.1 Modellanalytter

De fem legemidlene som ble brukt til optimalisering av EME-systemet var prometazin, amitriptylin, metadon, haloperidol og loperamid. Strukturene til modellanalyttene er vist i tabell 3.1. Disse ble valgt på grunnlag av tidligere erfaring med stoffene på EME (5) og deres fysikalsk-kjemiske egenskaper; de er alle upolare og basiske legemidler med pKa-verdier fra 8,05 til 9,76 (47). For optimering av MS-systemet ble amitriptylin brukt. Det ble gjort to metabolismeforsøk med amitriptylin, og ett metabolismeforsøk med hvert av de 4 andre stoffene.

Tabell 3.1: Molekylstruktur, log P og pKa-verdi for modellanalyttene.

Modellanalytt	Molekylstruktur (47)	Log P (47)	pKa-verdi (47)
Prometazin		4,29	9,05
Amitriptylin		4,81	9,76

Metadon		5,01	9,12
Haloperidol		3,66	8,05
Loperamid		4,77	9,41

3.2 Løsninger

Det ble laget stamløsninger på 1 mg/ml av amitriptylin, metadon, loperamid, haloperidol, prometazin og trimetylanilinumklorid. Amitriptylin ble løst i 30 mM maursyre, loperamid ble løst i 20 mM maursyre og haloperidol ble løst i 50 mM maursyre. Metadon, prometazin og trimetylanilinumklorid ble løst i vann. Løsningene ble oppbevart i kjøleskap ved +5 °C.

Prøveløsningene til optimeringsforsøkene på CE ble laget ved å fortynne stamløsningene med 100 mM kaliumdihydrogenfosfatløsning (KH_2PO_4 -løsning) med pH 7,4 til 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for hver av de fem modellanalyttene.

Akseptorløsningen i optimeringsforsøkene på CE var 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trimetylanilinumklorid (IS) i 100 mM maursyre i spenningsoptimeringsforsøket og donorhastighetsforsøket med den 2 cm lange membran. I de andre forsøkene ble 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IS i 10 mM maursyre brukt.

For å kalibrere CE-instrumentet ble det laget en egen kalibreringsløsning. Den ble laget ved å fortynne stamløsningene til modellanalyttene til 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ og stamløsningen til IS til 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ med 100 mM maursyre.

Til metabolismeforsøkene ble stamløsningene brukt til å lage løsninger på 100 μM av stoffene i 100 mM KH_2PO_4 -løsning med pH 7,4, som igjen ble brukt til å lage en reaksjonsløsning med konsentrasjon på 10 μM av stoffene i KH_2PO_4 -løsningen.

Akseptorløsningen ved MS-forsøkene var 10 mM maursyre.

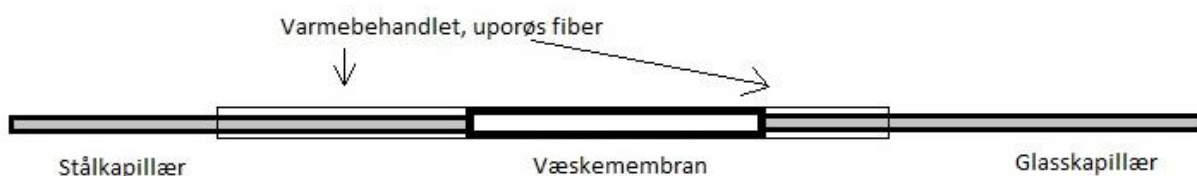
3.3 Kjemikalier

Amitriptylin hydroklorid, loperamid hydroklorid, haloperidol, metadon hydroklorid, trimetylanilinumklorid, 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) og β -nikotinamid adenin dinkleotid 2-fosfat (NADPH) ble anskaffet fra Sigma Aldrich (Steinheim, Tyskland). MgCl_2 ble anskaffet fra Fluka, Sigma Aldrich. Prometazin hydroklorid ble anskaffet fra Mecobenz (et gammelt dansk selskap). Natriumdihydrogenfosfat, kaliumdihydrogenfosfat, acetonitrill og maursyre ble anskaffet fra Merck (Darmstadt, Tyskland).

Rottelevermikrosomer (RLM) fra BD Biosciences/Corning BV (male Sprague-Dawley, pooled, 20 mg/ml, cat.no 452501, Amsterdam, Nederland) eller fra Sigma.-Aldrich (Sprague-Dawley, pooled, 20mg/ml produktnummer M9066) ble brukt. De humane levermikrosomene (HLM) kom fra BD Biosciences/Corning BV (pooled, 50 donorer, cat. no. 452156).

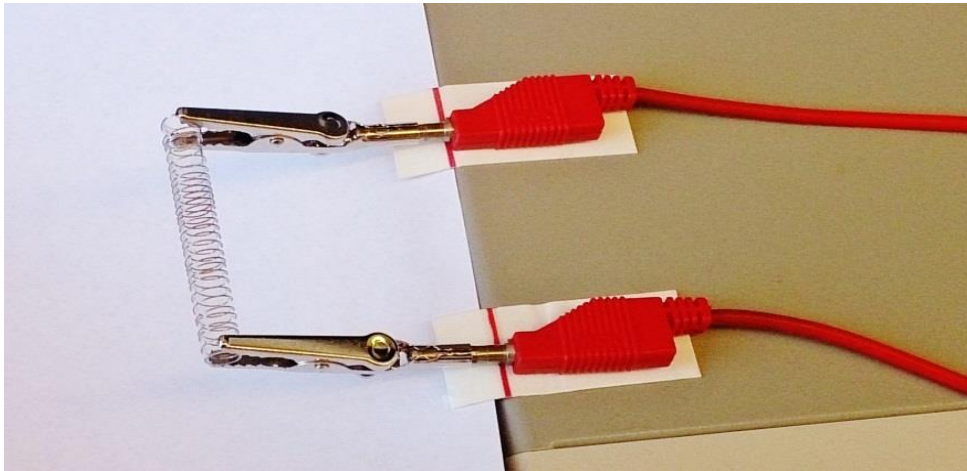
3.4 Ekstraksjonsbetingelser CE

En kunstig væskemembran ble dannet ved å immobilisere NPOE i porene til en porøs hullfiber av polypropylen (Plasmaphan P1LX polypropylene hollow fibre (id: 330 μm , 150 μm tykke vegger og 0,4 μm porestørrelse)) anskaffet fra Membrana, (Wuppertal, Tyskland). Porene lukkes når fiberen varmebehandles, og da kan det ikke lenger dannes en væskemembran ved å tilsette organiske løsningsmidler til porene i fiberen. Omtrent 6 cm av hullfiberen ble smeltet på et kvartskapillær med 75 μm indre diameter og 375 μm ytre diameter (TSP75375, Polymicro technologies, Pheonix, Az, USA). For å gjøre det lettere å trekke hullfiberens smeltede del av kapillæret, ble det lagt i sprit. Delen av hullfiberen som var varmebehandlet hadde lukkede porer og fungerte derfor både som avgrensning av væskemembranen og som isolasjon for strømmen i reaksjonskammeret. Etter at glasskapillæret var trukket ut av hullfiberen ble det stukket inn i hullfibret fra den andre enden, for å smelte hullfiberen og avgrense den porøse delen fra begge sider. Et stykke teflon-tubing som var like langt som ønsket membranlengde ble lagt over den delen av hullfiberen som skulle forbli porøs for å beskytte denne delen mot varme. Hullfiberen ble så smeltet på kvartskapillæret. Dette ble også lagt i sprit, og kapillæret ble trukket ut slik at kapillæret var inni den uporøse, smeltede delen av fiberen, men ikke i den porøse delen som skulle utgjøre membranen. Dermed fungerte kapillæret som en robust og rigid forlengelse av den uporøse hullfiberen. I den andre uporøse enden av hullfiberen ble det stukket inn et stålkapillær (id: 120 μm , od: 260 μm , nebuliseringsnål # G1946-20177, Agilent Technologies, Waldbronn, Tyskland). Stålkapillæret var tykt nok til at det ble en tett skjørt, og ledet akseptorfase fra akseptorfasepumpen inn i fiberen via en slange. Figur 3.1 viser en skisse av membranen. 2 μl NPOE per cm membran ble pipettert og fordelt utover hullfiberen med mikropipette. Hullfiberen gikk da fra å være hvit til å bli gjennomsiktig.



Figur 3.1: Skisse av membranen brukt til optimeringsforsøk på CE.

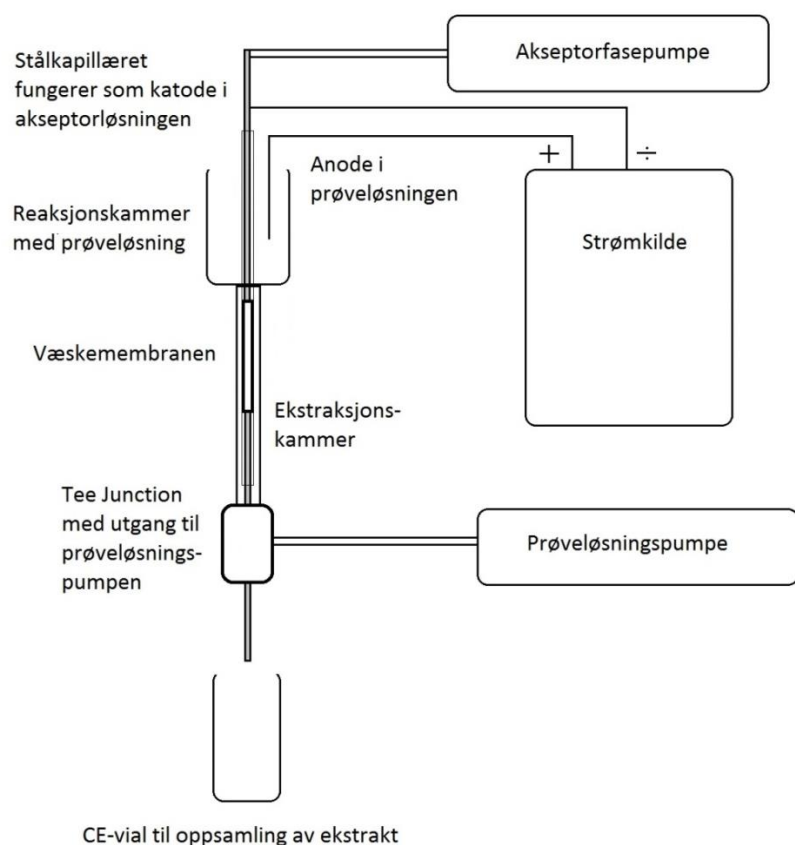
Varmekilden som ble brukt var en hjemmelaget ”ovn” som er vist i figur 3.2. Varmekilden bestod av en elektrode snurret rundt et glassrør som det ble satt strøm på.



Figur 3.2: Varmekilden som ble brukt til å smelte hullfiberen.

Akseptorfasen ble pumpet gjennom fiberen av en mikrosprøytepumpe (74900 series, Cole-Parmer Instrument, Chicago, IL, USA) med en gasstett 2500 μ l sprøyte (1002 series, Hamilton, Bonaduz, Sveits). Fra sprøyten gikk det en plastslange, som ble skjøtet på hullfiberen ved et stålkapillær. Prøveløsningen ble sugd ut av reservoaret av en mikrosprøytepumpe (KDS-1000-CE, KD Scientific, Holliston, MA, USA) med en gasstett 5000 μ l sprøyte (1005 series, Hamilton). Reservoaret var et 1500 μ l eppendorfrør (Eppendorf, Hamburg, Tyskland) hvor bunnen var fjernet og erstattet med en teflonslange med indre diameter på 0,76 mm (Tygon peristaltic tubing, PTT-76, Globalfia, Fox Island, WA, USA). Enden av teflonslangen ble festet til en Tee Junction fra Upchurch Scientific (P-713) (Wertheim, Tyskland) med tilsammen tre utganger; en til teflonslangen, en til glasskapillæret og den siste til en plastslange som ledet inn til prøveløsningspumpen. Figur 3.3 viser en skisse av oppsettet.

Som ekstern strømkilde ble en ISO-TECH IPS-603 (RS Components Ltd, Northamptonshire, England) anvendt. Katoden var en stålelektrode som ble snurret rundt stålkapillæret som førte akseptorløsningen ned til membranen. For å unngå gassbobledannelse og blokkering inni membranen ble katoden forlenget av en tynn platinaelektrode. Platinaelektroden var tredd inn i membranen fra den uporøse enden av hullfiberen før nålen og fiberen ble koblet sammen, og etter sammenkoblingen var det kontakt mellom platinaelektroden og nålen. Anoden var en platinaelektrode som ble stukket ned i prøveløsningen i reservoaret.



Figur 3.3: Skisse av EME-oppsett ved optimering på CE.

Under alle ekstraksjonene ble strømmen gjennom membranen målt ved hjelp av en strømmåler (U1253A, Agilent technologies). Ujevn strøm gjennom membranen er ugunstig fordi det tyder på ustabile betingelser for ekstraksjonen.

3.5 EME med offline CE deteksjon for optimaliseringsforsøk

Ved optimaliseringsforsøkene ble prøveløsningen med de fem modellanalyttene sugd fra eppendorfrøret, som fungerte som et reservoar. Ekstraktene ble samlet opp manuelt over 5 minutter før de ble analysert på CE med UV-deteksjon. Det ble (stort sett) laget 3 paralleller. Akseptorløsningen inneholdt trimetylanilinumklorid, som fungerte som intern standard. Dette var viktig for å korrigere for varierende injeksjonsvolum i CE og tap av ekstraktvolum grunnet fordamping.

3.6 Analysebetingelser CE

Kapillærelektroforese med et Agilent 3D CE-instrument. Seperasjonskapillæret var et fused-silika kapillær med indre diameter på 75 µm og ytre diameter på 375 µm (TSP 75375, Polymicro technologies). Det hadde en effektiv lengde på 24,5 cm og stoffene ble detektert med UV ved 200 nm. Som seperasjonsbuffer ble 25 mM natriumdihydrogenfosfat-buffer, justert til pH 2,7 med 2 M fosforsyre anvendt. Spenningen ble satt til 20 kV.

3.7 Beregning av utbytte og oppkonsentrering

Utbytte (R): andel analytt i donorløsningen som ekstraheres over til akseptorløsningen

$$R = \frac{N(a, \text{final})}{N(d, \text{initielt})} * 100\% = \frac{C(a) * V(a)}{C(d) * V(d)} * 100\%$$

Likning 4: Utbytte

N(a, final) er mengden analytt i akseptorfasen etter endt ekstraksjon. N(d, initielt) er mengden analytt i donorløsningen til å begynne med. C(a) er konsentrasjonen av analytt i akseptorløsningen etter endt ekstraksjon. V(a) er volumet av akseptorløsningen. C(d) er konsentrasjonen av analytt i donorløsningen til å begynne med. V(d) er volumet av donorløsning.

Oppkonsentrering (EF): forholdet mellom konsentrasjonen i akseptorløsningen etter ekstraksjon og konsentrasjonen i donorløsningen før ekstraksjon.

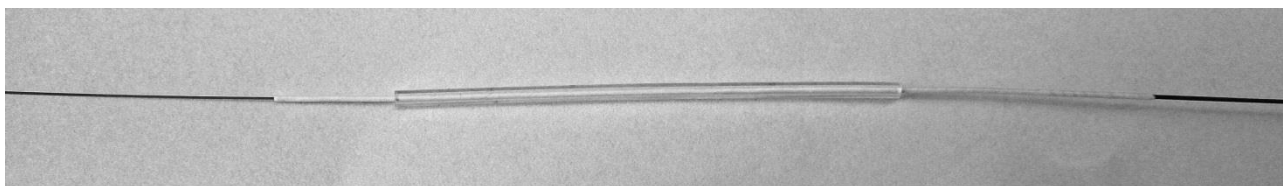
$$EF = \frac{C(a)}{C(d)}$$

Likning 5: Oppkonsentrering

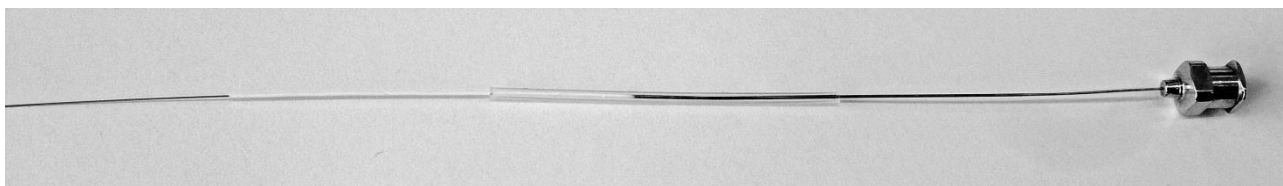
3.8 Ekstraksjonsbetingelser MS

Måten membranen ble laget på hadde blitt optimert før EME-systemet ble koblet online til MS. Fra da av ble det brukt et omtrent 18 cm langt CE kapillær med i.d.: 100 μm og o.d.: 245 μm (TSP100245, Polymicro technologies). De nye dimensjonene minket motstanden akseptorløsningen møtte i EME-systemet fordi den indre diameteren var større. Sjansen for lekkasje av akseptorløsningen ut av skjøtene og selve membranen i systemet ble derfor mindre. Dette kapillæret var også lettere å tre inn i hullfiberen før smelting fordi den ytre diameteren var mindre. Istedenfor stålkapillæret som ledet akseptorløsningen inn i membranen ble en 7,7 cm lang stump kanyle med od: 0,36 mm og i.d.: 0,18 mm (Metal hub 7748-14, Hamilton), som det var smeltet et tynt lag teflon (PTFE HS Sub-Lite-Wall med o.d.: 0,508 mm før varming og i.d.: 0,1524 mm etter varming, Zeus, Orangeburg, SC, USA) utenpå brukt. Teflonlaget gjorde at hullfiberen enkelt kunne tres på kanylen. I tillegg isolerte teflonlaget kanylen fra donorløsningen slik at kanylen fungerte som en intern elektrode (katode) i akseptorløsningen.

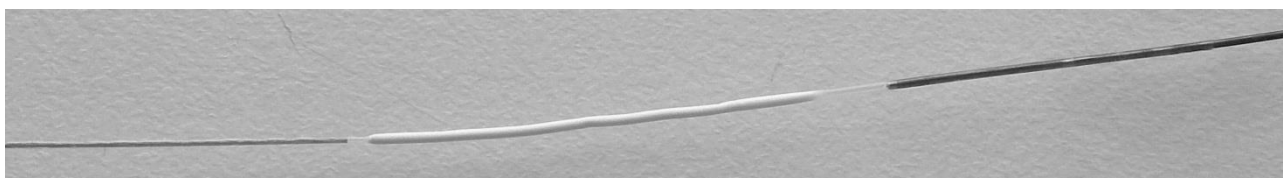
Hullfiberen ble tredd omtrent 2 cm opp på kanylen. Fra den andre enden ble kvartskapillæret stukket inn i hullfiberen, slik at kapillærenden og kanyleenden møttes inne i hullfiberen. En omtrent 4 cm lang bit teflon-tubing ble lagt rundt den delen av hullfiberen som satt på glasskapillæret for å beskytte denne delen av fiberen mot varmen i oven (figur 3.4). Delen av hullfiberen som satt på kanylen ble smeltet rundt kanylen slik at porene ble lukket og fiberen ble gjennomsiktig. Teflontuben ble så flyttet på, slik at den dekket 2 cm av hullfiberen som ikke var smeltet (figur 3.5). Hullfiberen ble så smeltet på kapillæret slik at det kun var en 2 cm lang del av fiberen igjen som fremdeles var porøs. Kanylen kunne enkelt trekkes ut og tres inn igjen i fiberen. Kvartskapillæret med fiberen påsmeltet kan legges i sprit i 5-15 min for å gjøre det enklere å trekke den ut slik at glasskapillæret begynner der den porøse delen av fiberen slutter (figur 3.6). Kapillæret fører ekstraktet inn til MS via en CE-elektrospray.



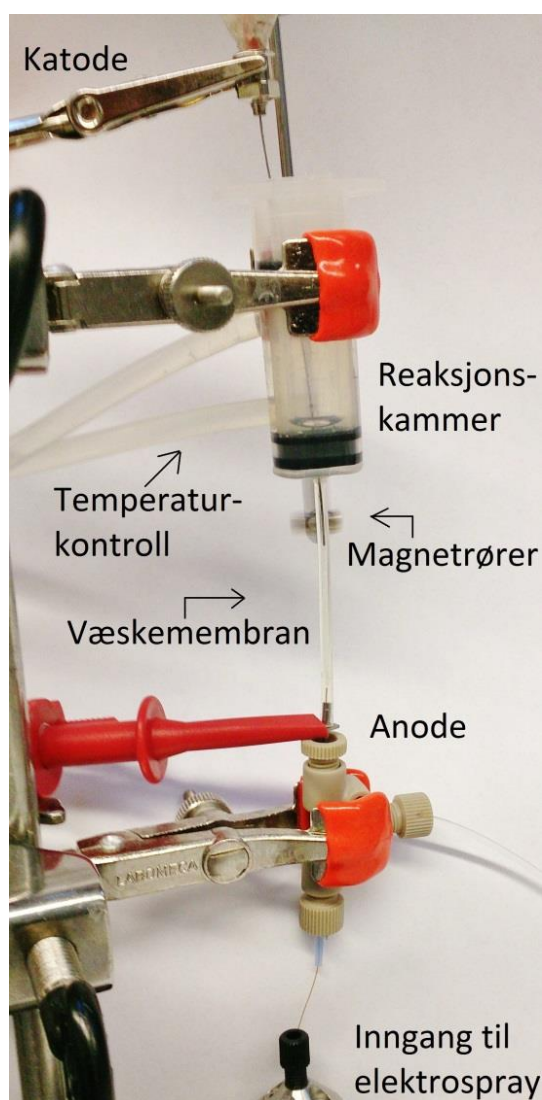
Figur 3.4: Hullfiberen tredd på glasskapillæret og kanylen før smelting. En omtrent 4 cm lang bit teflon-tubing beskytter det som skal forbli porøst mot varme.



Figur 3.5: Hullfiberen er smeltet på kanylen og teflon-tubingen er flyttet på, slik at den kun dekker det av den uporøse delen som skal utgjøre membranen.



Figur 3.6: Etter å ha trukket kanylen og glasskapillæret litt ut slik at den porøse delen av hullfiberen er fri, er væskemembranen klar etter tilsetning av NPOE.



Figur 3.7: Bilde av EME-oppsettet koblet online til MS.

Pumpene og strømkilden var de samme som ble anvendt i optimeringsforsøkene. Eppendorfrøret som ble brukt som reservoar i CE-optimeringen ble byttet ut med et reaksjonskammer som hadde temperaturkontroll satt til 37 °C. I bunnen av reaksjonskammeret var det en liten magnet og en magnetrører (IKA eurostar digital, Staufen, Tyskland) roterte 668 per minutt for å sørge for omrøring i reaksjonskammeret. Figur 3.7 viser hvordan systemet var satt opp. Hastigheten akseptorfasen ble pumpet gjennom membranen ble økt fra 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ i optimeringsforsøkene til 12 $\mu\text{l}/\text{min}$ når EME-systemet var koblet til MS. Under alle forsøkene unntatt det første systemstabilitetsforsøket ble det brukt et kvartskapillær som var etset med 48 % flussyre i enden. Kvartskapillæret ble dermed spissere og ga en mer stabil spray og et sterkere signal enn da ubehandlede glasskapillær gjorde.

3.9 Metabolisme direkte koblet til MS

Man kan sette et CE-kapillær direkte ned i elektrospyren og hastighetene som akseptorfasen ble pumpet gjennom membranen med var kompatible med denne ioniseringsmetoden.

Reaksjonsløsningen som ble ekstrahert og analysert under metabolismeforsøkene bestod av modellanalytt, 100 mM KH_2PO_4 -løsning, milli-Q vann og 100 mM MgCl_2 . Komponentenes blandingsforhold er vist i tabell 3.2. Ved tilsetning av 1 ml til reaksjonskammeret gikk det 12,5 min (ved donorflow 0,75 ml/t) og 9 min (ved donorflow 1ml/t) før 150 μl ble sugd ut. Denne tiden ble brukt til å undersøke om spyren var stabil. Når det var 850 μl reaksjonsløsning igjen i reaksjonskammeret ble 50 μl 20 mg/ml rottelevermikrosomer tilsatt. Levermikrosomene ble tilsatt før NADPH for å se om det ble fall i signalet for amitriptylin, slik som tidligere observert (13). Etter varierende tid, når signalet hadde stabilisert seg, ble 100 μl 10 mM NADPH tilsatt. Dette hadde gitt konsentrasjon i prøveløsningen på 1 mM NADPH hvis det hadde blitt tilsatt til reaksjonskammeret samtidig med levermikrosomene. Siden det gikk litt tid mellom tilsetning av levermikrosomene og NADPH, var det en noe høyere konsentrasjon av NADPH. Det er vanlig å gjøre metabolismeforsøk med NADPH-konsentrasjon mellom 1 og 2 mM (28).

Det ble gjort forsøk med både humane levermikrosomer og mikrosomer fra rottelever. Det ble tatt ut prøver til LC-MS for å sammenligne halveringstiden for amitriptylin. Dette tilsvarer tradisjonelle metabolismestudier, hvor det tas ut prøver underveis som analyseres på LC-MS etter proteinfelling med for eksempel acetonitrill (28). Under metabolismen av amitriptylin med RLM ble prøver tatt ut langt hyppigere enn normalt for å kunne se stigninger og fall i konsentrasjonene til analyttene slik som ved online-kobling. Prøvevolumene var 40 μl , felt med likt volum acetonitrill, blandet på vortex og lagt på is mens resten av metabolismen pågikk. De ble så lagt i fryser på $-80\text{ }^\circ\text{C}$ og analysert på et senere tidspunkt.

Levermikrosomene ble tatt ut fra fryser med $-80\text{ }^\circ\text{C}$ så tett opp til forsøkene som mulig, og ble holdt kalde på is fram til tilsetning i reaksjonskammeret. Tiden mellom levermikrosomene ble tatt ut fra fryseren og til de var tilsatt varierte derfor noe fra forsøk til forsøk. Forsøkene ble gjort i et lokale med mange mennesker og nær dør som ofte gikk opp og igjen. Dette kan ha påvirket stabiliteten av elektrospyren.

Tabell 3.2: Oversikt over komponentene i prøveløsningen og reaksjonsløsningen som ble brukt i metabolismeforskene.

	Prøveløsning	Reaksjonsløsning	
<i>Komponent</i>	<i>Mengde</i>	<i>Mengde</i>	<i>Konsentrasjon i reaksjonsløsningen</i>
Modellanalytt 10 eller 3.5 μM	100 μl	100 μl	0,35 eller 1 μM
100 mM KH_2PO_4^- løsning	100 μl	100 μl	10 mM
100 mM MgCl_2	50 μl	50 μl	5 mM
Milli-Q vann	600 μl	600 μl	-
Levermikrosomer 20mg/ml	0	50 μl	1 mg/ml
NADPH 10 mM	0	100 μl	1 mM
SUM	850 μl	1000 μl	-

MS-analysene ble utført med betingelsene i tabell 3.2.

Tabell 3.2: Betingelser for MS-analysene

Ioniseringsmodus	Positiv
Kapillærspenning	- 3320 V
End plate offset	- 500 V
Tørkegass	Nitrogen
Hastighet tørkegass	8,0 L/min
Temperatur tørkegass	325 C
m/z-intervall for scanning	15-500 m/z
Scanhastighet	100 ms
Scan mode	Full scan
Instrument	LC/MSD Trap XCT (Agilent technologies, Waldbronn, Tyskland)

3.10 Tradisjonell analysemetoder for in vitro metabolismestudier av legemidler (LC-MS)

Prøver ble tatt ut ved gitte tider under metabolisme av amitriptylin ved bruk av RLM og HLM. Etter proteinfelling med likt volum acetonitrill som prøvevolumet (40 µl) ble prøvene fryst ned til -80 °C og analysert med LC-MS på et senere tidspunkt. Prøvene ble analysert med under betingelsene i tabell 3.4.

Tabell 3.4: Betingelser for separasjon med HPLC.

Mobilfase A	0,1 % maursyre i 95 % H ₂ O, 5 % Acetonitril
Mobilfase B	0,1 % maursyre i 95 % Acetonitril, 5 % H ₂ O
Kolonne	Phenomenex, Kinetex 2,6µ, XB – C18 100A, 100X 2,id:10 mm
Kolonnetemperatur	40 °C
Mobilfasehastighet	0,5 ml/min
Mobilfasegradient	fra 0-3,5 min: fra 20-70 % B fra 3,5-6,0 min: 20 % B
Analysetid	6 min
Injeksjonsvolum	5 µl
Sampler-temperatur	5 °C

Deteksjon med MS ble utført ved hjelp av en referansemetode ved Institut for farmaci, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet (48).

3.11 Beregning av halveringstid

Halveringstid ($t_{1/2}$) er definert som tiden det tar for at konsentrasjonen av legemiddelet er halvert. Antatt at elimineringen av legemiddel følger 1. ordens kinetikk, beskriver likning 6 legemiddelkonsentrasjonen ved tiden t. Halveringstiden beregnes fra likning 7, som bygger på likning 6 (28).

$$C_t = C_0 * e^{-kt}$$

Likning 6: Konsentrasjon av legemiddel ved tiden t

C_t er legemiddelkonsentrasjonen ved tiden t. C_0 er startkonsentrasjonen av legemiddelet. k er eliminasjonskonstanten og vil være stigningstallet til en konsentrasjonskurve som følger 1. ordens kinetikk i et ln-transformert plott. k brukes til å beregne halveringstiden som vist i likning 7.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

Likning 7: Halveringstid

4 Resultat og diskusjon

4.1 Optimering av systemet ved offline CE

EME-systemet bestod av en prøveløsning (donorløsning), en akseptorløsning, en positiv og en negativ elektrode, et reservoar med prøveløsning og en SLM (kunstig væskemembran) dannet ved å immobilisere NPOE i porene på en hullfiber. Akseptorløsningen strømmet kontinuerlig gjennom hullfiberen, og dermed på innsiden av den kunstige væskemembranen.

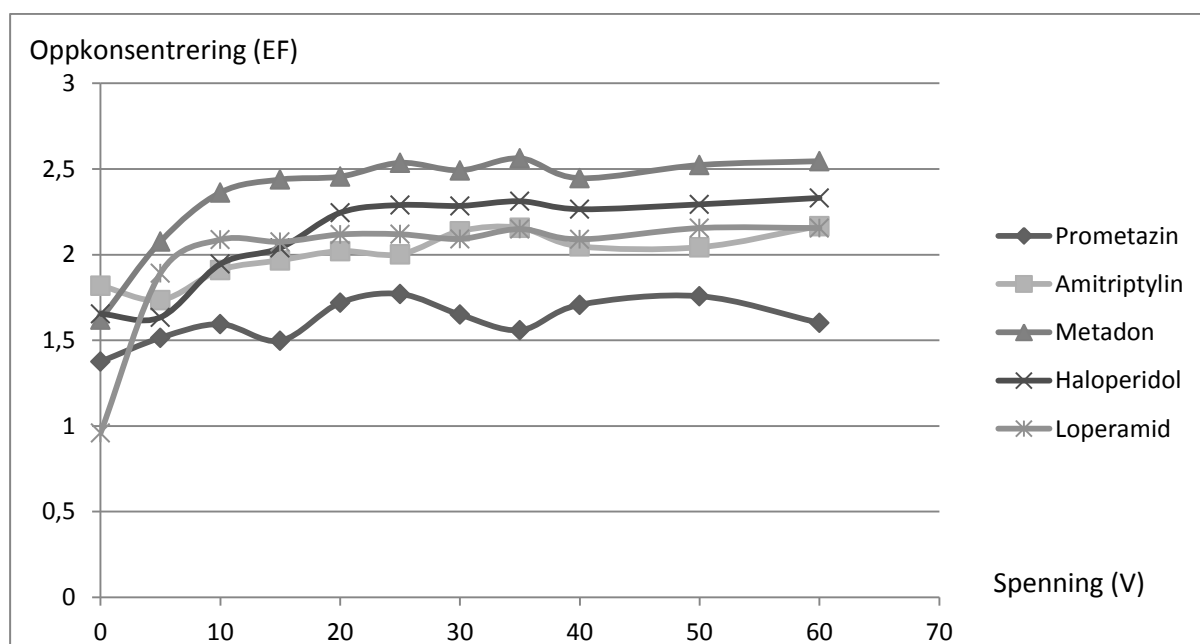
Akseptorløsningen bestod av internstandard (100 µg/ml) først løst i 10 mM og senere i 100 mM maursyre og ble pumpet gjennom hullfiberen med en hastighet på 3 µl/min.

Prøveløsningen befant seg på utsiden av hullfiberen og bestod av de fem modellanalyttene løst i 100 mM KH_2PO_4 -løsning med fysiologisk pH (pH=7,4). Konsentrasjonen av modellanalyttene i prøveløsningen var 10 µg/ml. Prøveløsningen ble sugd ut av reservoaret og forbi væskemembranen slik at analyttene hele tiden ble ekstrahert fra ny prøveløsning. Den negative elektroden (anoden) ble plassert i akseptorløsningen og den positive elektroden (katoden) ble plassert i donorløsningen slik at de basiske legemidlene ble ekstrahert over membranen.

Optimeringen av EME-systemet ble gjort ved å ekstrahere de fem modellanalyttene fra prøveløsningen over til akseptorløsningen under forskjellige betingelser. Det ble gjort forsøk med varierende spenning, ulike lengder på væskemembranen og ulike sugeshastigheter på pumpen som sugde prøveløsningen ut av reservoaret og forbi membranen. I tillegg ble det utført forsøk for å undersøke om ekstraksjonsutbyttene var stabile over tid og om graden av væskemembranens transparens påvirket ekstraksjonsutbyttene. Ekstraktene ble samlet opp manuelt over 5 minutter og analysert på CE med UV-deteksjon. Det ble stort sett gjort 3 paralleller av hver ekstraksjon.

4.1.1 Spenningsoptimering

Spenningsoptimering ble gjort ved å ekstrahere analyttene over væskemembranen med forskjellig spenning. Forsøkene ble utført med spenning fra 0 til 60 V og resultatene er framstilt i figur 4.1. For amitriptylin og prometazin ble ikke ekstraksjonsutbyttene påvirket av økende spenning. For de andre stoffene økte ekstraksjonsutbyttene til et platå var nådd ved omtrent 10-15 V. Dette er også tidligere sett i spenningsoptimeringsforsøk for EME (11,13).



Figur 4.1: Oppkonsentrering (EF) vs. ekstraksjonsspenning. Akseptorflow: 3 μ l/min. Donorflow: 1,0 ml/t.. Membranlengde: 2,4 cm.

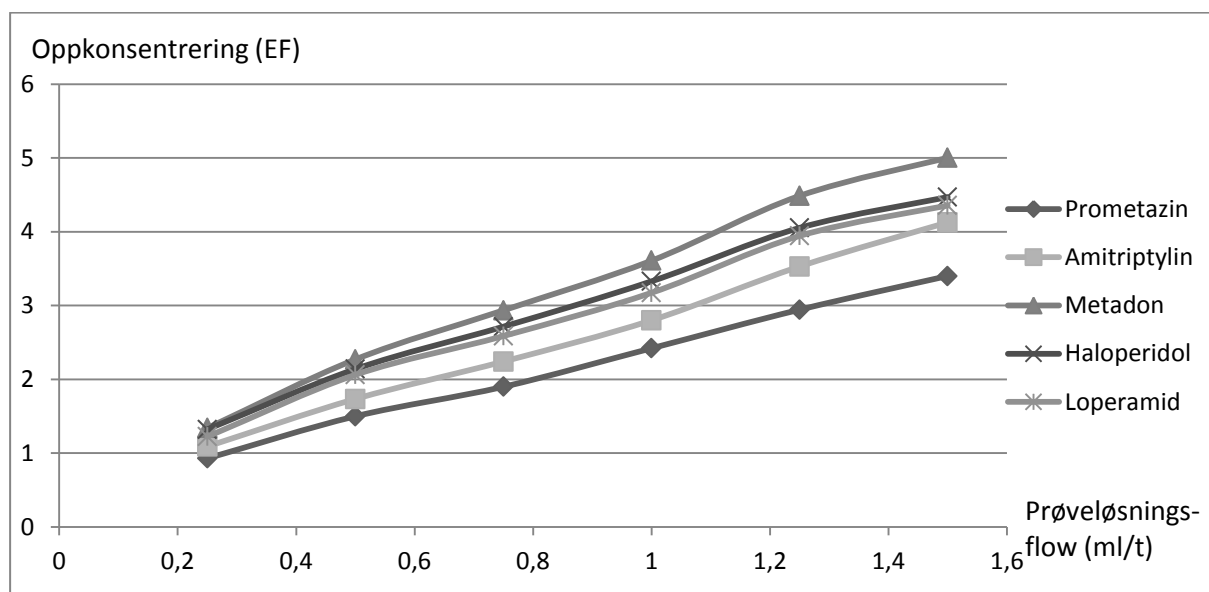
Ekstraksjon av analytt uten påsatt spenningsfelt forklares ved at uioniserte molekyler i prøveløsningen med pH 7,4 vil diffundere passivt over væskemembranen. Stoffene vil protoneres i den sure akseptorløsningen, og hindres i å diffundere tilbake til prøveløsningen gjennom væskemembranen. Når platået for tre av stoffene ble nådd var det fordi det hastighetsbestemmende trinnet i massetransporten da var transporten av ionene til og fra væskemembranen, og ikke distribusjonen av analyttene fra donorløsningen til væskemembranen (12).

Figur 4.1 viser at ekstraksjonseffektiviteten ikke økte så mye ved høyere spenning. Derimot er ekstraksjonshastigheten høyere med spenning sammenlignet med ekstraksjon uten spenning (6).

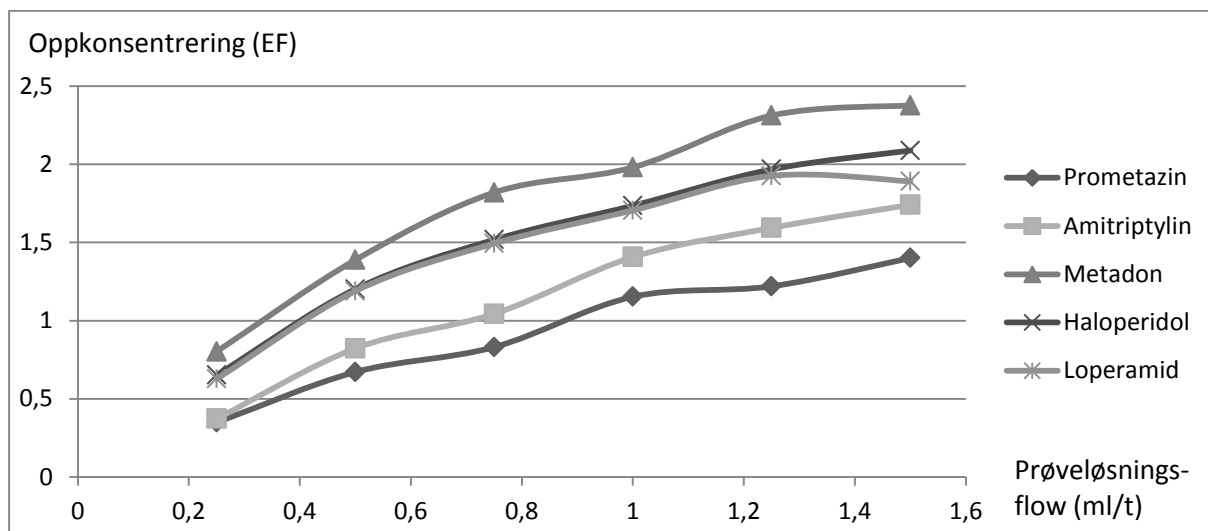
Flere av stoffene nådde et platå med spenning mellom 10 og 15 V. Det er ønskelig å bruke spenning som ligger over dette platået for å ha repeterbare ekstraksjoner og 20 V var derfor spenningen som ble valgt for videre forsøk.

4.1.2 Hastighet på donorløsningen

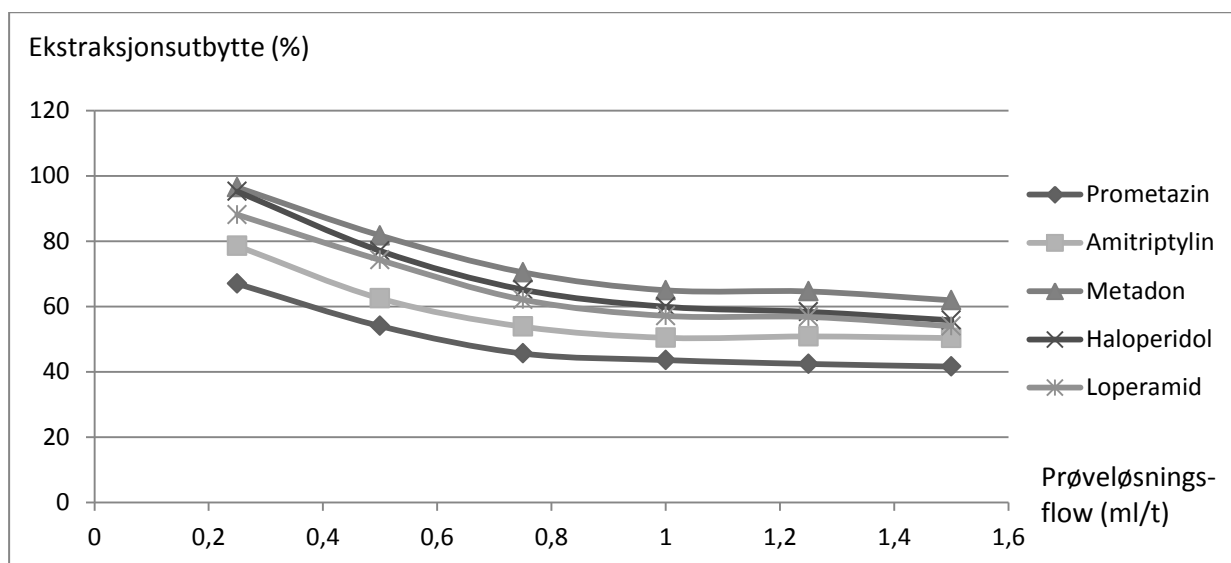
Optimal prøveløsningsflow ble funnet ved å suge prøveløsningen forbi membranen i forskjellige hastigheter. Hastigheter fra 0,25 ml/t til 1,5 ml/t ble forsøkt. Figur 4.2 og 4.4 viser resultater med en membran som var 2 cm lang og figur 4.3 og 4.5 viser resultater med en membran som var 1 cm lang. Økende prøveløsningsflow ga økt konsentrasjon i ekstraktet, men lavere utbytte.



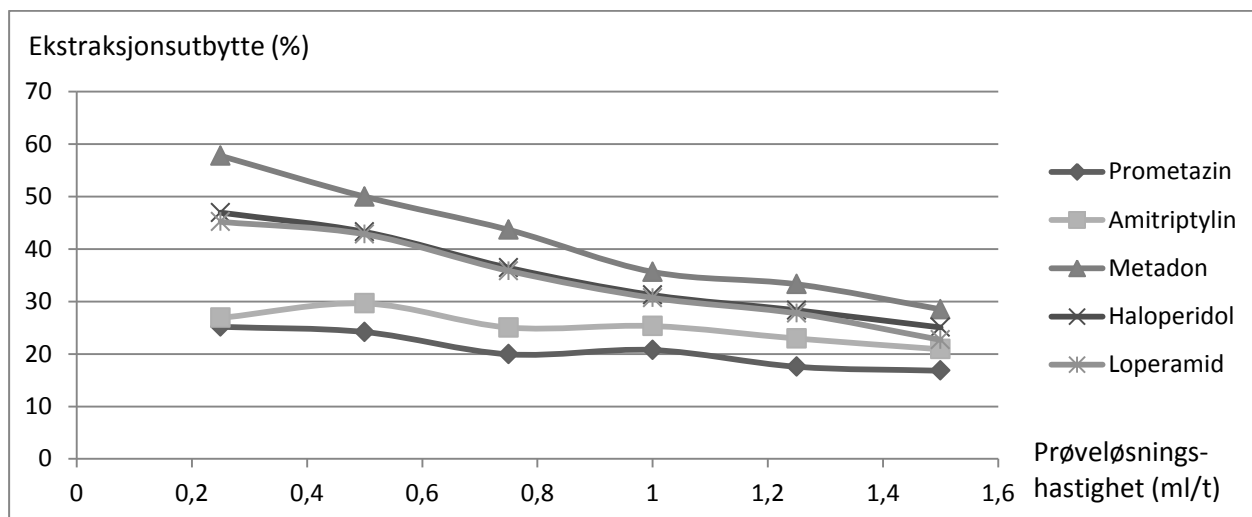
Figur 4.2: Oppkonsentrering (EF) vs. prøveløsningsflow. Akseptorflow: 3 μ l/min. Spenning: 20 V. Membranlengde: 2 cm.



Figur 4.3: Oppkonsentrering (EF) i ekstraktene vs. prøveløsningsflow. Akseptorflow: 3 μ l/min. Spenning: 20 V. Membranlengde: 1 cm.



Figur 4.4: Ekstraksjonsutbytte vs. prøveløsningsflow. Akseptorflow: 3 μ l/min. Spenning: 20 V. Membranlengde: 2 cm.



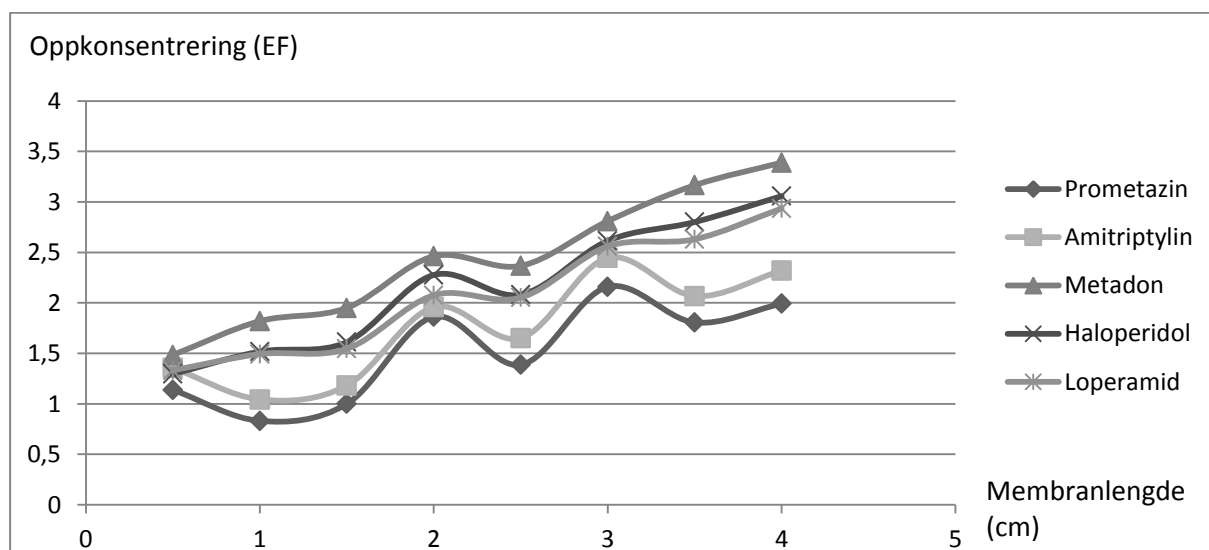
Figur 4.5: Ekstraksjonsutbytte vs. prøveløsningsflow. Akseptorflow: 3 μ l/min. Spenning: 20 V. Membranlengde: 1 cm.

Ved høyere prøveløsningsflow var det mer analytt som passerte membranen og dermed ble mer ekstrahert over i et uendret volum fordi akseptorflowen ble holdt konstant, og konsentrasjonen i ekstraktene økte. Lavere utbytte ved høyere prøveløsningsflow er også tidligere blitt observert i chip-systemet (7). Det antas at tiden analyttene oppholder seg ved membranen er avgjørende for hvor stor andel som blir ekstrahert over.

Prøveløsningsflowen ble satt til å være 0,75 ml/t i senere forsøk. Dette var både for å få høy konsentrasjon av analytt i ekstraktene og for at reservoaret ikke skulle tømmes så raskt, med tanke på at det var ønskelig å følge metabolismeforsøkene som skulle utføres senere i minst 1 time. Ved å suge ut 0,75 ml prøveløsning per time ble reservoaret med 1 ml prøveløsning tømt etter 1 time og 20 min.

4.1.3 Membranlengde

Membranlengdeoptimering ble gjort ved å utføre ekstraksjoner med membraner med ulike lengder. Membranen ble impregnert med 2µl NOPE per cm membran. Ellers var betingelsene like. Konsentrasjonen av analyttene i ekstraktene økte ved lengre membraner. Figur 4.6 viser hvordan konsentrasjonen av analyttene i ekstraktene stiger ved økt membranlengde.

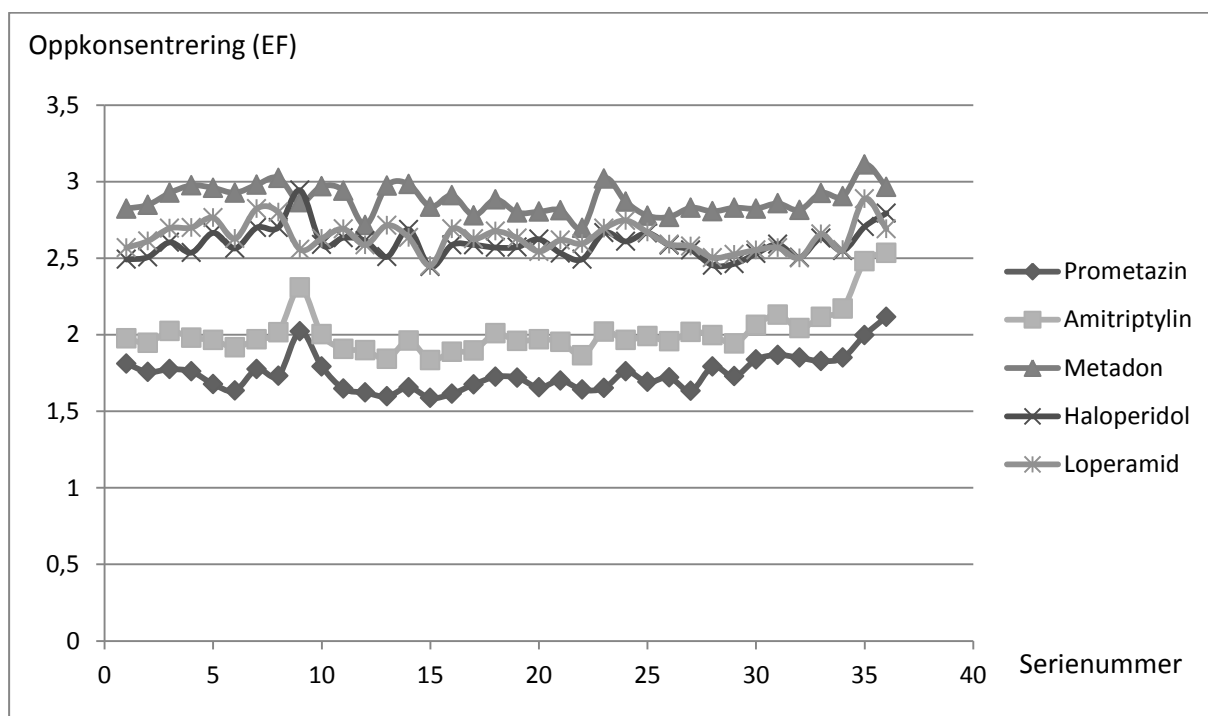


Figur 4.6: Oppkonsentrering (EF) vs. membranlengde. Spenning: 20 V. Akseptorflow: 3 ul/min. Donorflow: 0,75 ml/t.

En lengre membran ga stoffene et større område å diffundere gjennom. Høyere konsentrasjon i ekstraktene er derfor forventet når de andre parameterne ble holdt konstante. Graden av oppkonsentrering økte proporsjonalt med membranlengde både i dette og i et tidligere arbeid med membraner som var 1 - 5 mm (14). Dette samsvarer også med teorien om at ekstraksjonseffektivitet blant annet avhenger av overflatearealet av væskemembranen (36). Det var enklere å lage og å håndtere korte membraner enn lange. For å ha en håndterbar membran som ga god ekstraksjon av stoffene ble det brukt membraner som var 2 cm lange i alle etterfølgende forsøk.

4.1.4 Stabilitet over tid

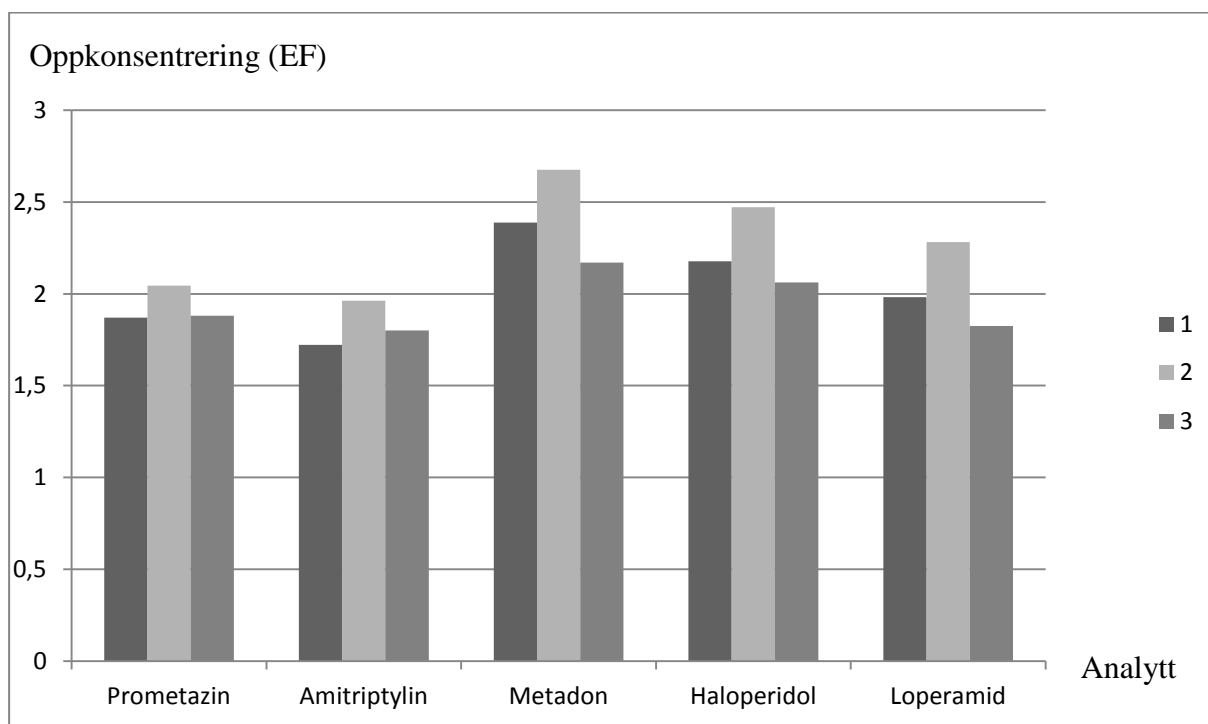
Det ble samlet opp 36 ekstrakter over et tidsrom på 4 timer. I figur 4.7 er konsentrasjonen av de 5 analyttene plottet mot ekstraktnummer. Det er noe varierende utbytte gjennom hele tidsrommet, men tendensen er at ekstraksjonsutbyttet er stabilt innenfor de eksperimentelle usikkerhetene som må påberegnes.



Figur 4.7: Oppkonsentrering (EF) av de fem analyttene i 36 ekstrakter.

4.1.5 Påvirker graden av fiberens transparens ekstraksjonsutbytte?

Ved tilsetning av NPOE til hullfiberen endres fiberens utseende seg fra å være hvit til å bli gjennomsiktig. Dette er en markør på at en væskemembran er blitt dannet. Etter en tid med ekstraksjon mistet imidlertid hullfiberen noe av transparensen, og det var varierende hvor raskt og i hvor stor grad fiberen ble hvitere. Hvis fiberen blir trukket i, blir den også hvitere, og dette kan forekomme når systemet settes opp. For å undersøke om fargen på fiberen påvirket ekstraksjonseffektiviteten ble det ekstrahert over en transparent fiber som senere ble trukket i, i to omganger. Figur 4.8 viser at konsentrasjonsforskjellene i ekstraktene ikke var vesentlige, og det antas derfor at fargen på fiberen ikke påvirket ekstraksjonseffektiviteten.



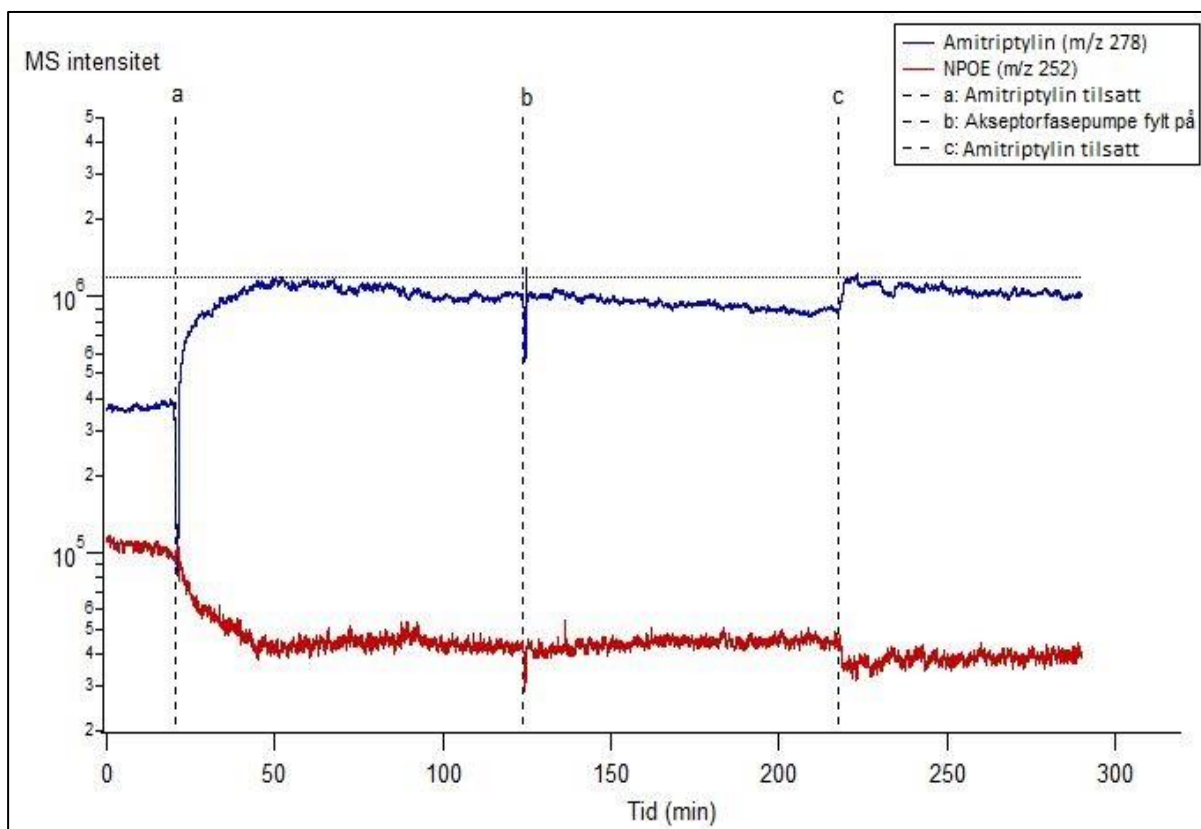
Figur 4.8: Oppkonsentrering (EF) i ekstraktene vs. fiberens transparens. 1: transparent fiber. 2: fiberen ble trukket i, og mistet noe av transparensen. 3: fiberen ble trukket i enda en gang. Spenning: 20 V. Akseptorflow: 3 ul/min. Prøveløsningsflow 0,75 ml/t. Membranlengde 2 cm.

4.2 EME-systemet koblet til MS

For å utføre in vitro metabolismestudier med online deteksjon av metabolitter ble systemet koblet til MS slik det er vist i figur 3.7. For å teste systemets responstid og stabilitet under de samme betingelsene som metabolismeforsøkene ble utført under, ble samme oppsett brukt i alle forsøk. Dette inkluderte omrøring og at temperaturen i reaksjonskammeret var 37 °C. Prøveløsningene bestod av analytt og MgCl₂ løst i 100 mM KH₂PO₄-løsning med pH 7,4, siden det er dette som ble brukt i metabolismeforsøkene. Akseptorløsningen var 10 mM maursyre og ble ført direkte inn i MS via en elektropray beregnet for CE-MS. I optimeringsforsøkene ble akseptorfasen pumpet gjennom fiberen med en hastighet på 3 µl/min. Dette ga lave og ustabile signaler ved MS-deteksjon, og hastigheten ble derfor økt til 12 µl/min. Hastigheten på donorløsningen ble også økt fra 0,75 ml/t til 1 ml/t. Den høyere hastigheten ga et sterkere og mer stabilt signal i MS. Når forholdet mellom hastigheten på donorløsningen og akseptorløsningen blir mindre, blir oppkonsentreringen lavere. Ved MS-deteksjon var det stabiliteten av sprayen som var kritisk, og samme grad av oppkonsentrering som ble oppnådd i CE-optimeringen var ikke nødvendig. Ved å suge ut 1,0 ml prøveløsning per time ble reservoaret tømt etter 1 time, og 1 time var tilstrekkelig reaksjonstid for in vitro metabolisme av de fem legemidlene med rottelevermikrosomer. I tillegg til mer stabil spray ble tiden det tok for akseptorfasen å komme fra væskemembranen til MS redusert til en fjerdedel, fra omtrent 2 min ved 3 µl/min til omtrent 0,5 min ved 12 µl/min. Dette gjorde at analyttene hadde mindre mulighet til å diffundere på veien, og konsentrasjonsendringer i reaksjonskammeret (tidligere kalt reservoaret) ville bli bedre detektert.

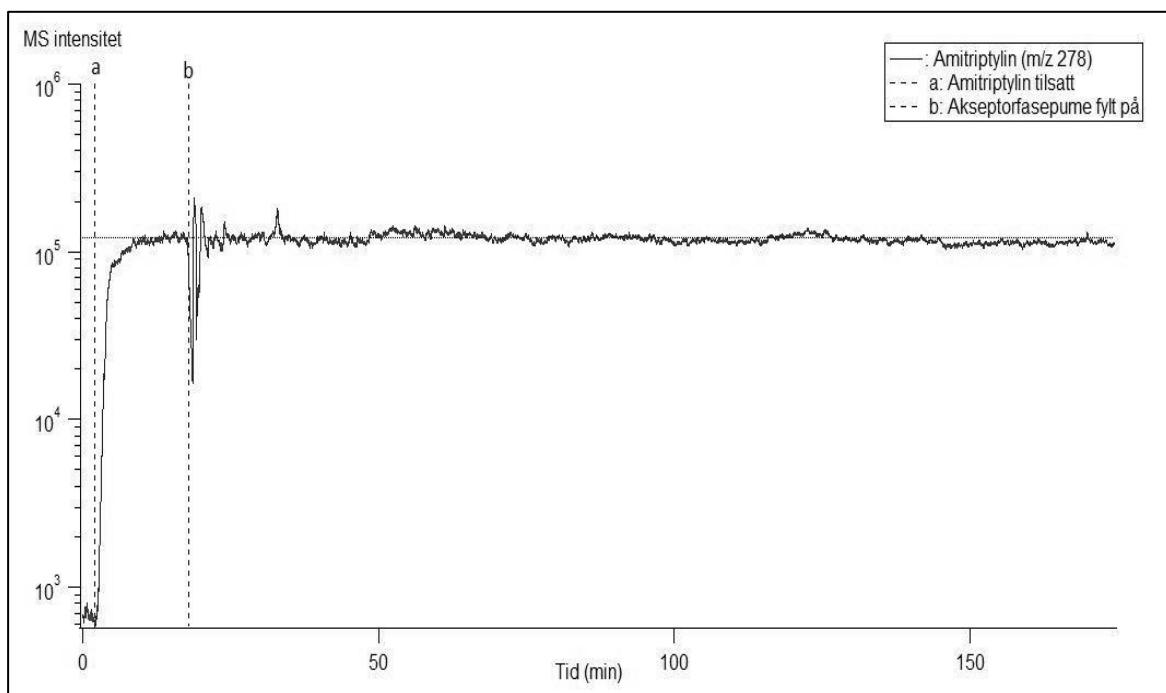
4.2.1 Systemstabilitet over tid

En prøveløsning bestående av amitriptylin og MgCl_2 løst i 100 mM KH_2PO_4 -løsning (pH=7,4) ble ekstrahert over membranen i 4,8 timer. NPOE har m/z-verdi 252 og ble målt for å undersøke om det var lekkasje av NPOE fra væskemembranen under ekstraksjonen. Resultatet fra forsøket er fremstilt i figur 4.9 og det er tydelig at signalet for NPOE synker når signalet for amitriptylin (m/z 278) stiger, noe som tyder på at amitriptylin gir ionesuppresjon av NPOE. I oppsettet som ble brukt i dette forsøket var elektroden (anoden) inni reaksjonskammeret. Det er en svak nedgang i signalstyrken over tid, og signalet øker tilsvarende mye ved tilsetning av ny prøveløsning til reservoaret. Den horisontale linjen som er tegnet inn på toppen av kurven for amitriptylin illustrerer dette.



Figur 4.9: Stabilitet av EME-ESI-MS-systemet med anoden i reservoaret.

Det antas at denne nedgangen i signalet skyldes elektrokjemisk degradering i reaksjonskammeret, og ved å flytte elektroden fra reaksjonskammeret til rett under membranen burde denne degraderingen bli mindre. Det ble derfor gjort et nytt stabilitetsforsøk hvor anoden var plassert rett under membranen, og resultatet er vist i figur 4.10.

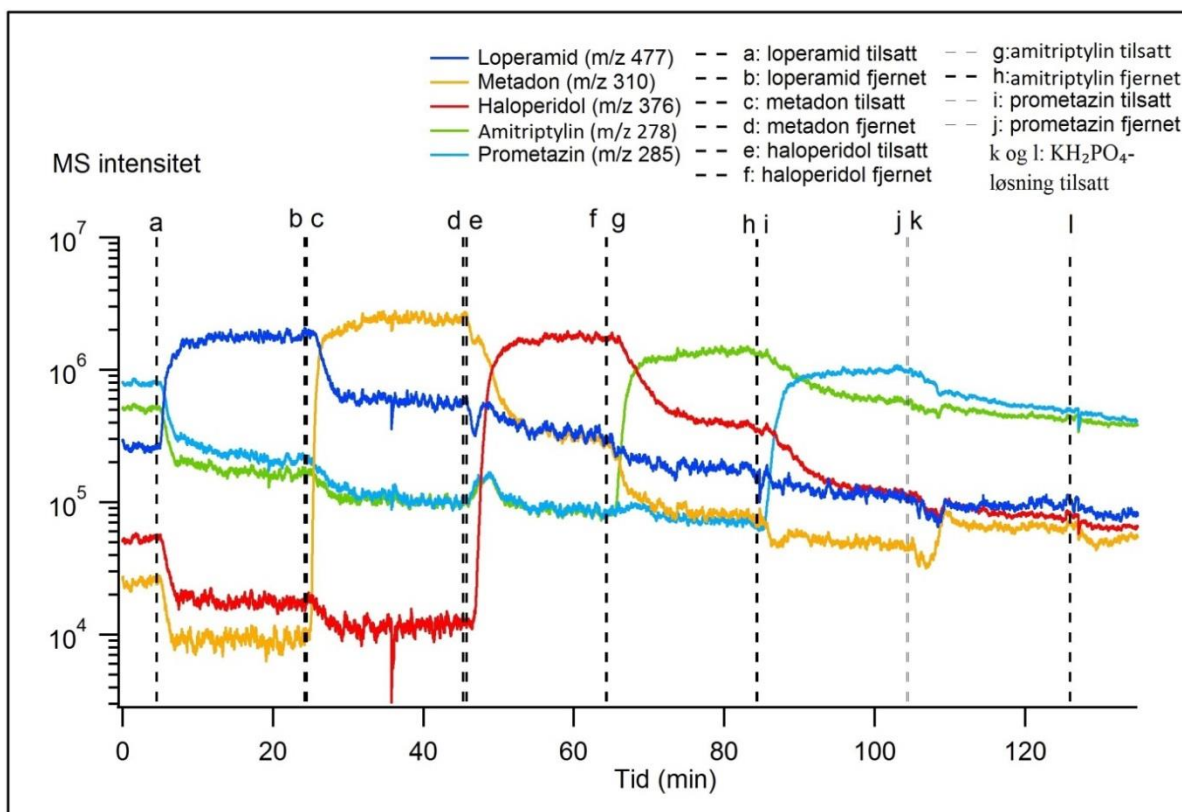


Figur 4.10: Stabilitet av EME-ESI-MS-systemet med anoden rett under reaksjonskammeret.

Med det nye oppsettet var det ikke nedgang i signalet for amitriptylin ved ekstraksjon over lengre tid. Oppsettet ble derfor beholdt og resten av forsøkene ble utført med slikt oppsett.

4.2.2 Responstid

Det ble utført forsøk for å undersøke hvor langt tid det tok etter tilsetning av stoffene i reaksjonskammeret til signaltoppen var nådd, og hvor fort signalet for stoffene sank etter at stoffene ble fjernet fra reaksjonskammeret. Prøveløsninger bestående av de fem analyttene og MgCl_2 løst i 100 mM KH_2PO_4 -løsning (pH=7,4) ble ekstrahert over membranen. En forsinkelse på omtrent 0,5 min grunnet den tiden det tar for akseptorløsningen å bevege seg fra væskemembranen til MS, gjorde at signalet ikke startet å stige med én gang. For å fjerne stoffene ble prøveløsningen sugd ut av reaksjonskammeret med pipette. Figur 4.11 viser hvordan signalet for stoffene synker og stiger ved tilsetning og fjerning av prøveløsning.



Figur 4.11: Responstid for de 5 modellanalyttene i EME-ESI-MS-systemet.

Kurvene for analyttene både steg og sank tregere enn forventet. En årsak kan være at væskemembranen var relativt tykk (200 μm) og at det derfor ikke var umiddelbar massetransport av analyttene fra donorløsningen til akseptorløsningen. Analyttene kan ha hopet seg opp i væskemembranen siden transporten gjennom væskemembranen er det hastighetsbestemmende trinnet i massetransporten (36). Forskjellen i analyttenes responstid kan skyldes at analyttene kan ha hatt forskjellig grad av protonering i væskemembranen, noe som påvirker den elektrokinetiske migrasjonen av analyttene. En annen årsak til treg respons kan være at ikke all prøveløsning, og dermed ikke all analytt, ble sugd ut av reaksjonskammeret før prøveløsning med ny analytt ble tilsatt. Den plata-lignende nedgangen i signalene kan i så fall skyldes fortynning av analyttene i reaksjonskammeret hver gang det ble tilsatt og fjernet prøveløsning fra reaksjonskammeret. En annen mulig årsak til treg respons er at analyttene kan ha adsorbent til systemet.

Den forsinkede responsen tyder på at ekstraksjonen skjer noe langsomt, og ved raske metabolismer vil konsentrasjonene som blir målt avvike noe fra konsentrasjonene i reaksjonskammeret.

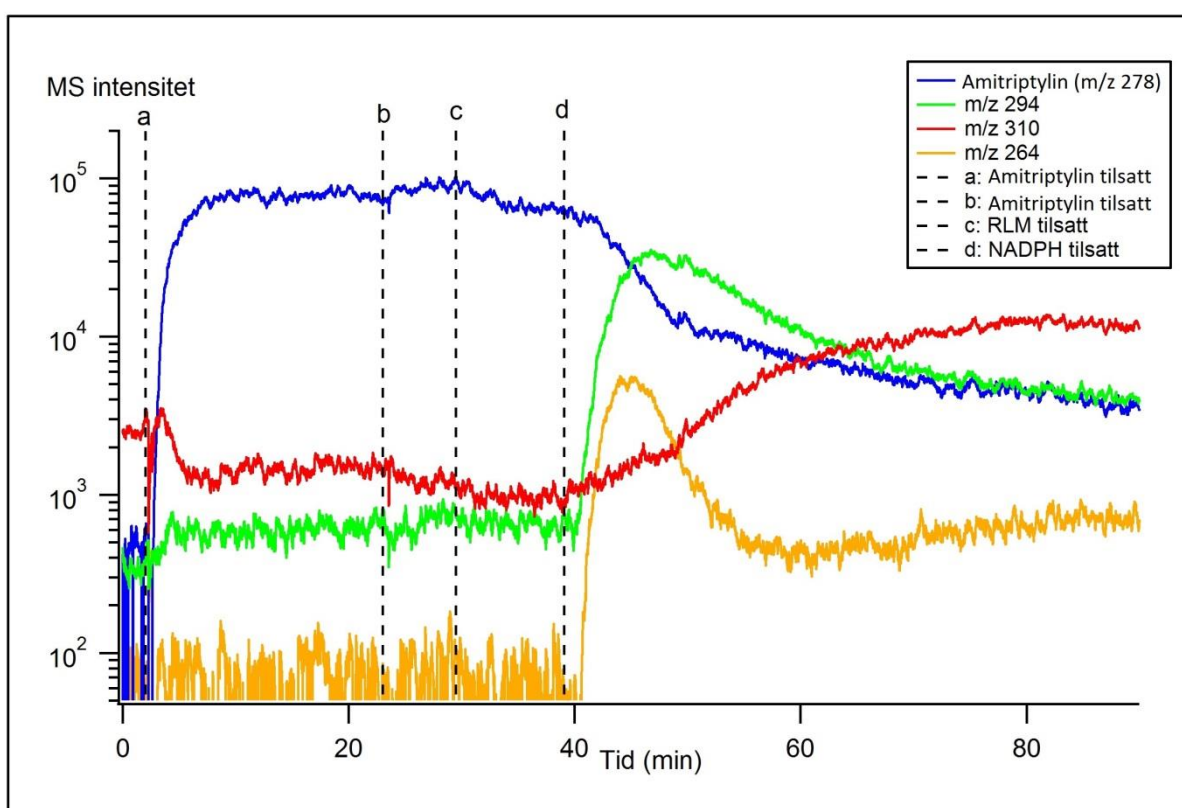
4.3 In vitro metabolismeforsøk

Metabolismereaksjonen ble utført i et reaksjonskammer med omrøring og temperaturkontroll. Temperaturen var satt til 37 °C og pH i reaksjonsblandingen var 7,4 for å etterligne fysiologiske forhold. Oksygentilgang er nødvendig for at den metabolske reaksjonen skal kunne skje, derfor var reaksjonskammeret åpent slik at oksygen fra luften kunne komme til. Levermikrosomer inneholder fase-1-enzymene, og disse enzymene trenger en reduserende kofaktor for å kunne katalysere metabolske reaksjoner. NADPH ble brukt som kofaktor i disse forsøkene. Spenningsfeltet over væskemembranen gjorde at kun de basiske legemiddele og deres upolare, basiske metabolitter ble ekstrahert over i akseptorløsningen. Nøytrale forbindelser migrer ikke elektrokinetisk og passerer derfor ikke væskemembranen. Polare stoffer passerer ikke væskemembranen fordi de ikke er løselige i NPOE og anioniske forbindelser blir værende i donorløsningen på grunn av spenningsfeltets retning. Partikulært materiale fra levermikrosomene passerer heller ikke membranen som også fungerer som et fysisk filter (7). Dette gjør at EME-systemet er kompatibelt med direkte kobling til MS uten prøveopparbeidelse for å fjerne matrixkomponenter (f. eks. salter og proteiner) som kan kontaminere MS og gi ionesuppresjon av analyttene.

Først ble en prøveløsning bestående av analytt og $MgCl_2$ løst i 100 mM KH_2PO_4 -løsning med pH 7,4 tilsatt. Når signalet var blitt stabilt ble levermikrosomer tilsatt. NADPH ble tilsatt for å starte reaksjonen. Det var varierende hvor lang tid det tok før signalet var stabilt. Siden prøveløsning kontinuerlig ble sugd ut av reaksjonskammeret måtte det i noen forsøk tilsettes prøveløsning flere ganger for å ende opp med den riktige konsentrasjonen av analytt, buffer og $MgCl_2$ etter tilsetning av levermikrosomer og NADPH. Fordi akseptorløsningen kontinuerlig ble analysert ble det dannet online-bilder av det som skjedde i reaksjonskammeret. Informasjon om hvordan konsentrasjonen av legemiddelet sank og hvordan konsentrasjonene til legemiddelets metabolitter steg og sank er framstilt grafisk i figurene.

4.3.1 Amitriptylin

Figur 4.12 viser metabolismeprofilen for amitriptylin generert ved å bruke levermikrosomer fra rotte. Prøveløsning bestående av amitriptylin og $MgCl_2$ løst i 100 mM KH_2PO_4 -løsning (pH=7,4) ble tilsatt til tomt reaksjonskammer ved a). Det tok litt tid før signalet var stabilt, og mer prøveløsning ble tilsatt ved b) for at konsentrasjonene av komponentene i reaksjonsblandingen skulle bli riktig etter tilsetning av RLM og NADPH. RLM ble tilsatt ved c) og den metabolske reaksjonen ble startet ved d) når NADPH ble tilsatt. Forsøket ble avsluttet etter omtrent 90 minutter.



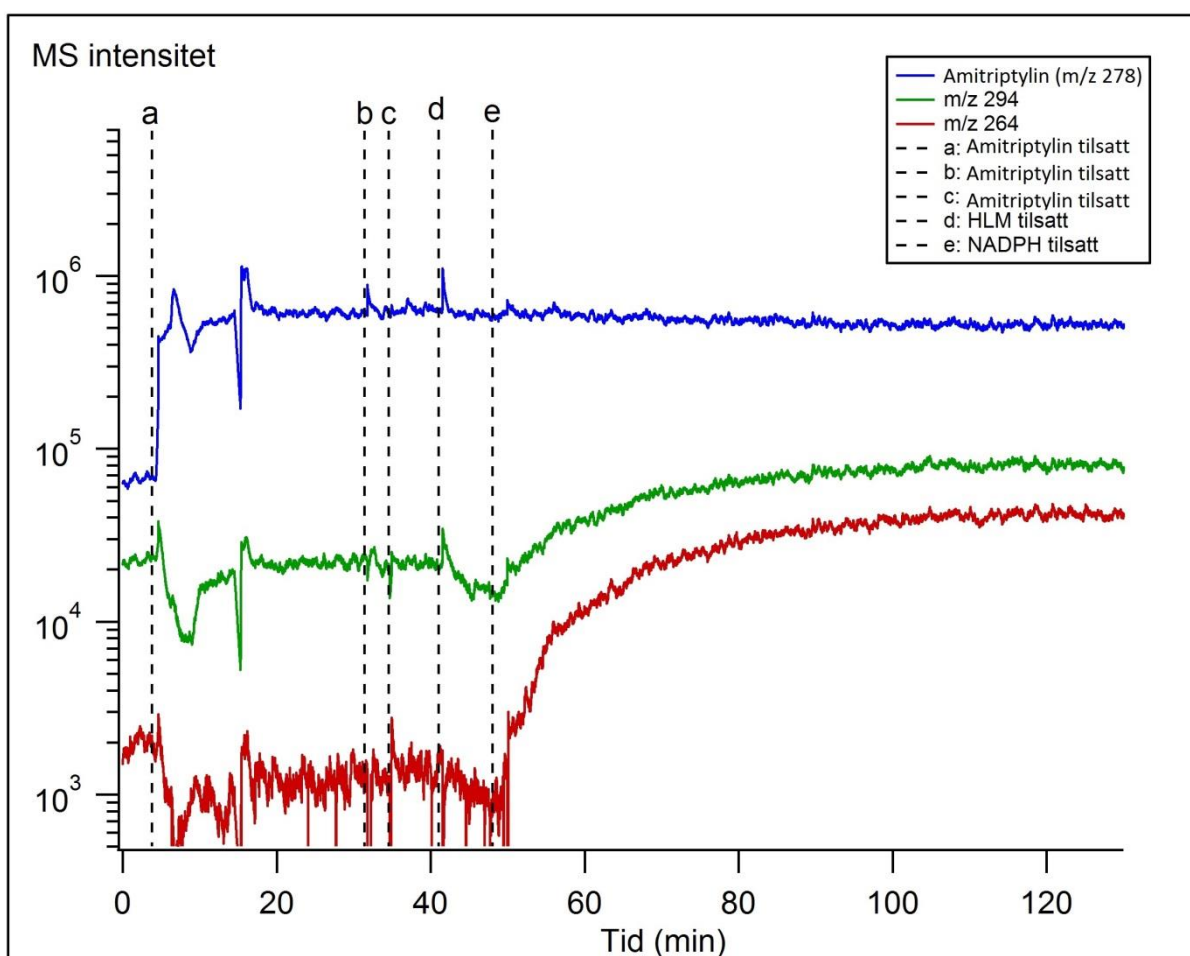
Figur 4.12: On line monitorering av in vitro metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

Etter tilsetning av RLM er det et fall i signalet for amitriptylin. Dette har også blitt observert tidligere og antas å skyldes at amitriptylin delvis binder seg til proteiner i reaksjonsløsningen (13). Fallet er imidlertid mindre uttalt enn det som tidligere har blitt observert.

Halveringstiden for amitriptylin i dette forsøket ble beregnet til å være 2,8 min. I liknende forsøk med en EME-probe ble halveringstiden beregnet til å være 1,6 min (13), og forsøk med chip-oppsatt ga halveringstid på 4,75 min (11). Amitriptylin og metabolittene har konsentrasjonsprofiler som ligner på konsentrasjonsprofilene fra de tidligere forsøkene med

EME-chip- og EME-probesystemene (11,13, 49). Hydroksyamitriptylin har m/z-verdi 294, nortriptylin har m/z-verdi 264 og dihydroksyamitriptylin har m/z-verdi 310. Når signalet for m/z 294 synker, øker signalet for m/z 310, noe som indikerer at amitriptylin først blir hydroksylert ett sted, for så å gjennomgå en ny hydroksylering. Figur 4.14 viser strukturene for amitriptylin og de antatte metabolittene. LC-MS-data viste at hydrokyleringene kan skje flere steder (avsnitt 4.4.1).

Figur 4.13 viser metabolismeprofilen for amitriptylin generert ved å bruke humane levermikrosomer.

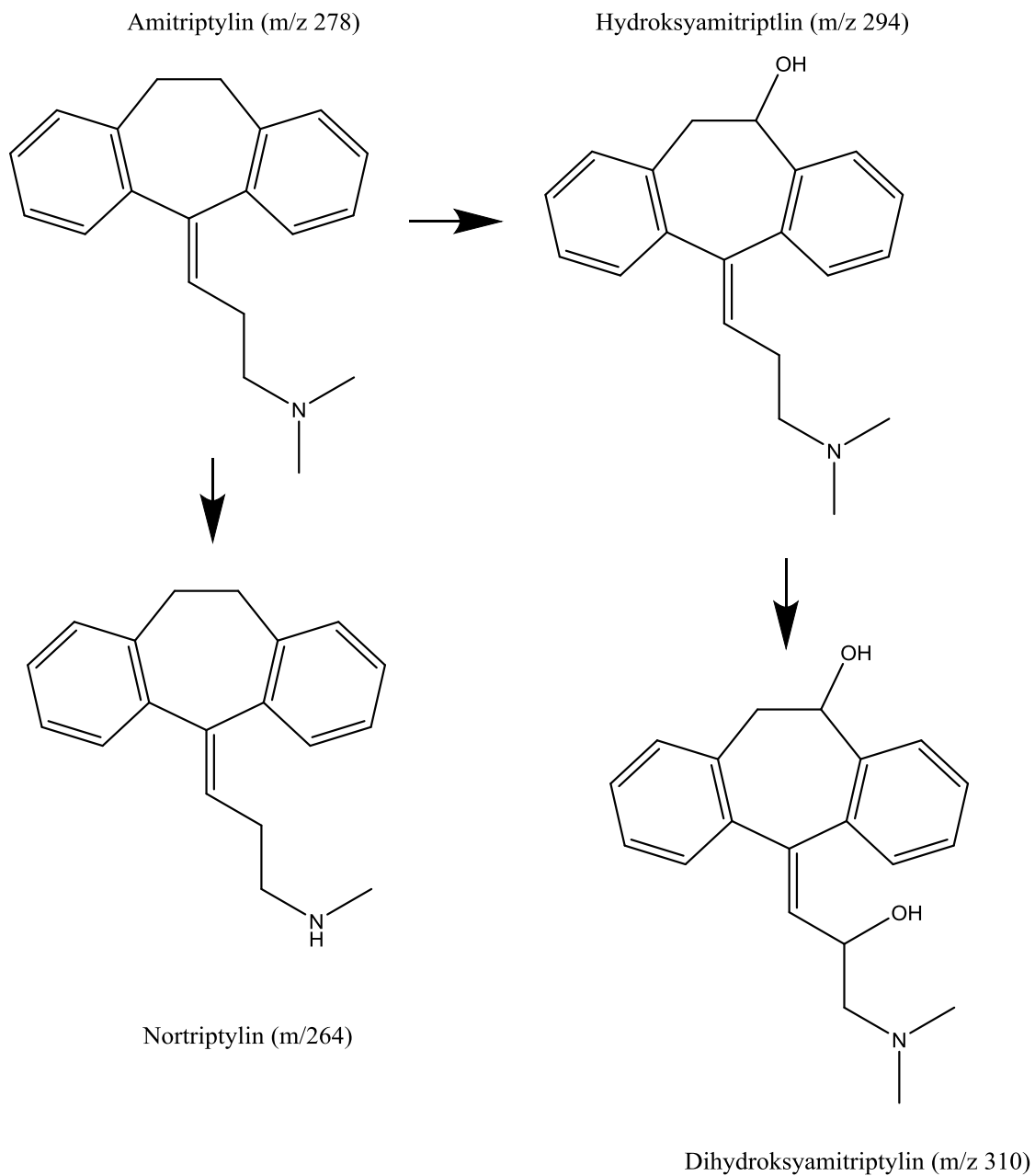


Figur 4.13: On line monitorering av in vitro metabolisme av amitriptylin med humane levermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

Metabolismereaksjonen med humane mikrosomer var mye langsommere enn reaksjonen med mikrosomer fra rotte, og reaksjonsløsningsvolumet var derfor 2 ml i dette forsøket.

Halveringstid for dette forsøket er beregnet til å være 105,3 min. Etter tilsetning av humane mikrosomer var det ikke et markant fall i signalet for amitriptylin slik det var ved tilsetning av

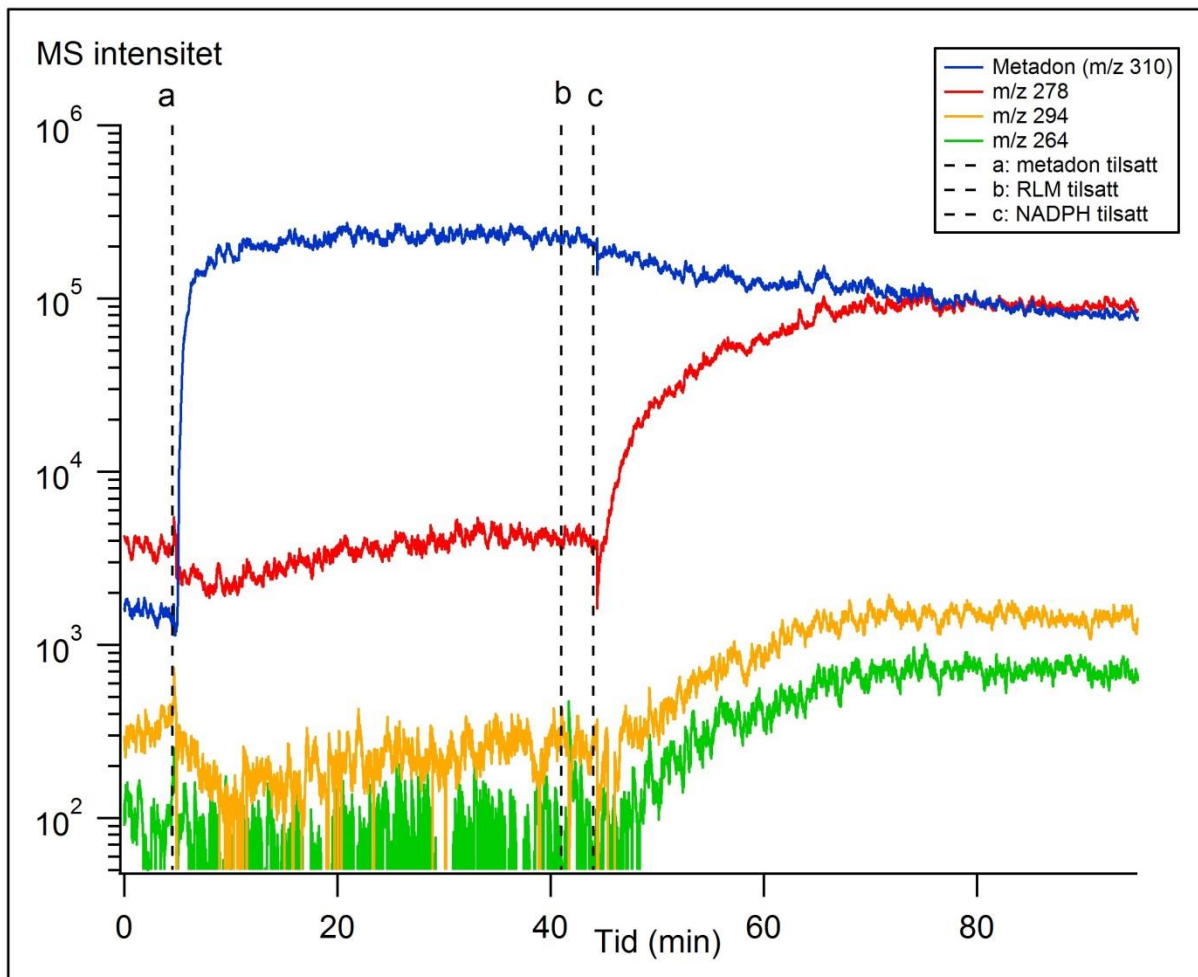
RLM. Med unntak av stoffet med m/z-verdi 310 ble det ved bruk av HLM detektert stoffer med samme m/z-verdier som ved bruk av RLM, og det antas at dette er de samme stoffene. Forsøket ble avsluttet etter omtrent 120 min.



Figur 4.14: Antatte metabolitter av amitriptylin. I figuren er et forslag til én stereoisomer av hydroksyamitriptylin og én stereoisomer av dihydroksyamitriptylin vist (11,13,49).

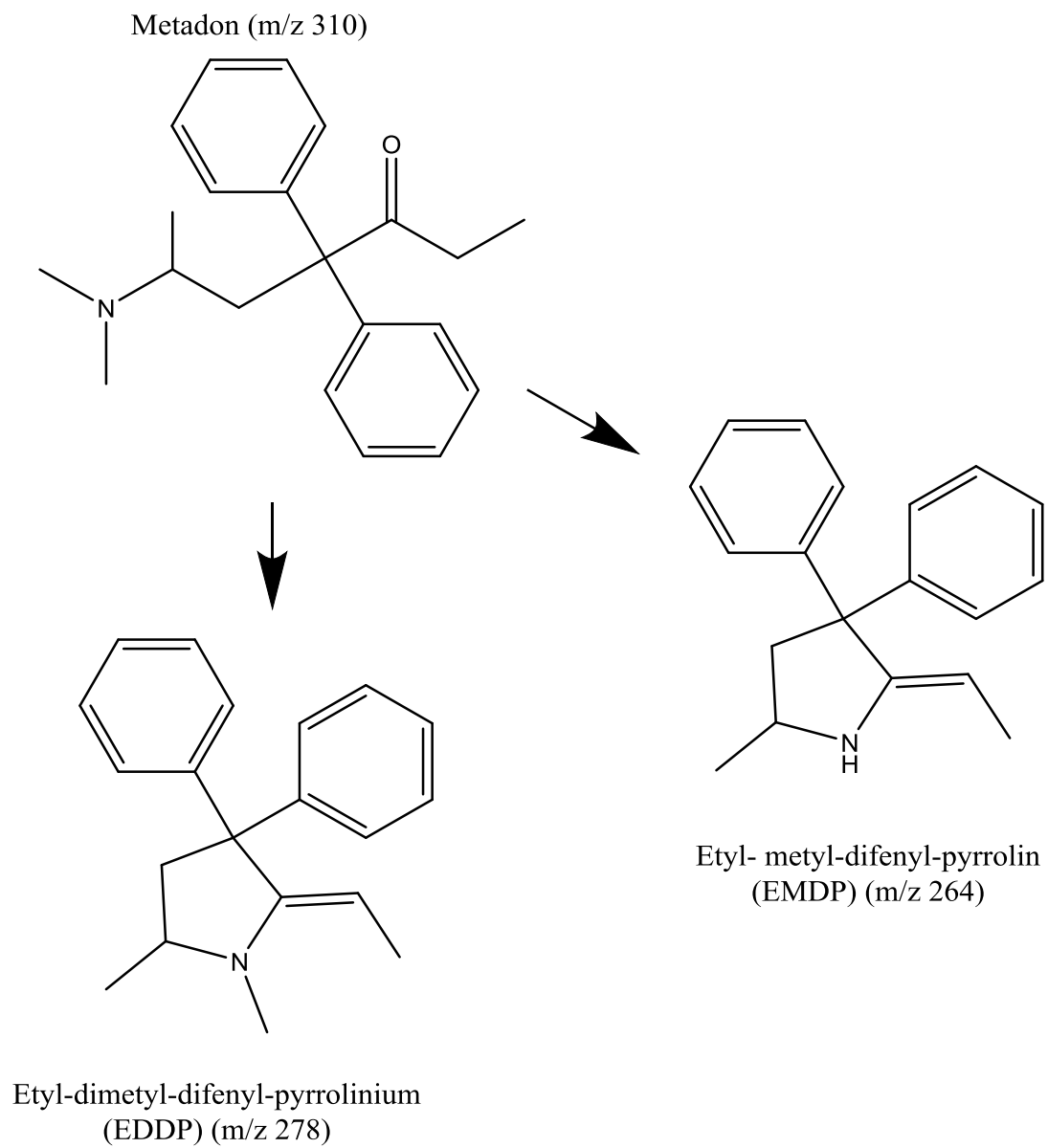
4.3.2 Metadon

Figur 4.15 viser metabolismeprofilen for metadon generert ved å bruke levermikrosomer fra rotte.



Figur 4.15: On line monitorering av in vitro metabolisme av metadon med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

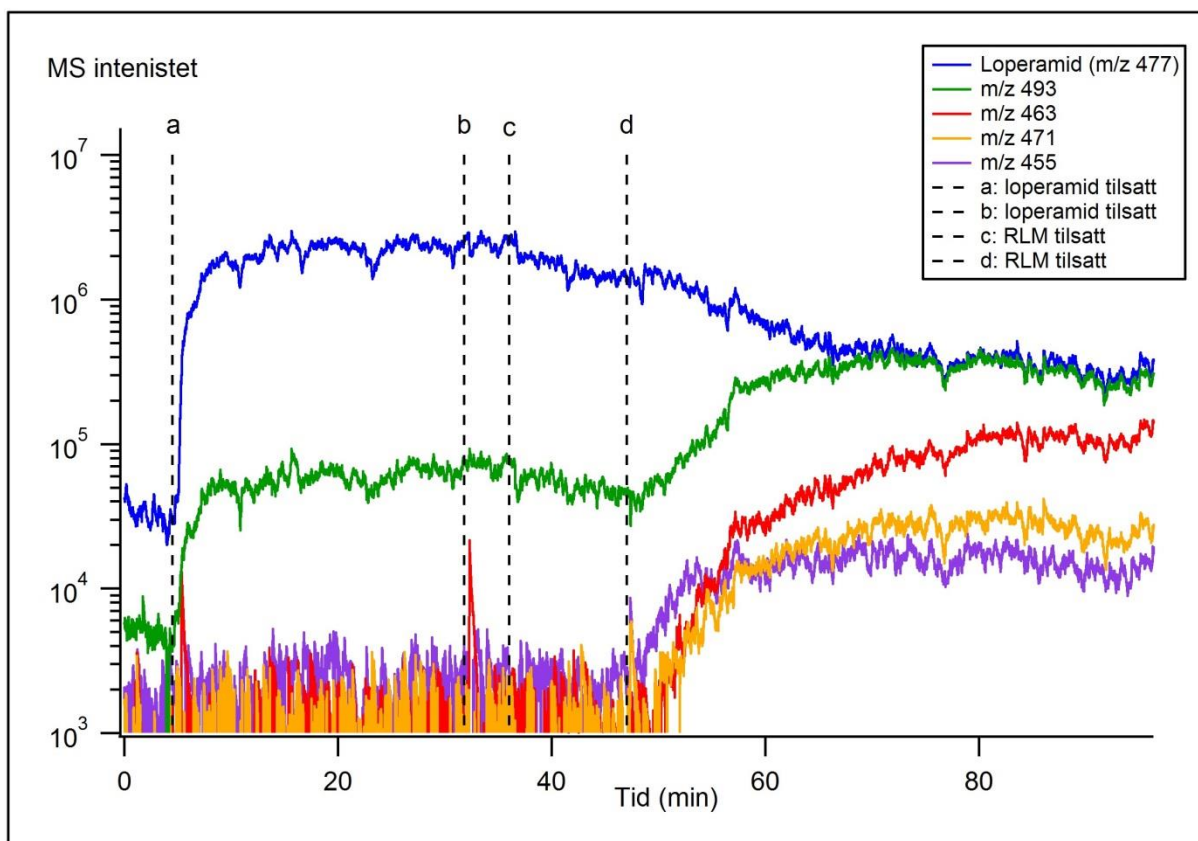
Det var ikke et markant fall i signalet for metadon etter tilsetning av RLM. Halveringstiden for metadon i dette forsøket er beregnet til å være 20,8 min. I et lignende metabolismeforsøk med en EME-probe ble halveringstiden beregnet til å være 14 min (49). To hovedmetabolitter av metadon med m/z-verdiene 278 (etyl-dimetyl-difenyl-pyrrolinium (EDDP)) og 264 (etyl-metyl-difenyl-pyrrolin (EMDP)) er beskrevet i litteraturen (50). Metabolittene monitorert i dette forsøket antas å være disse og strukturene er vist i figur 4.16. Metabolitt med m/z-verdi 294 ble ikke funnet beskrevet ved litteratursøk. Dette stoffet har et kurveforløp som indikerer at det kan være en metabolitt og har amu-forskjell fra modersubstansen på 16.



Figur 4.16: Strukturere til de to hovedmetabolittene EMDP og EDDP av metadon (50).

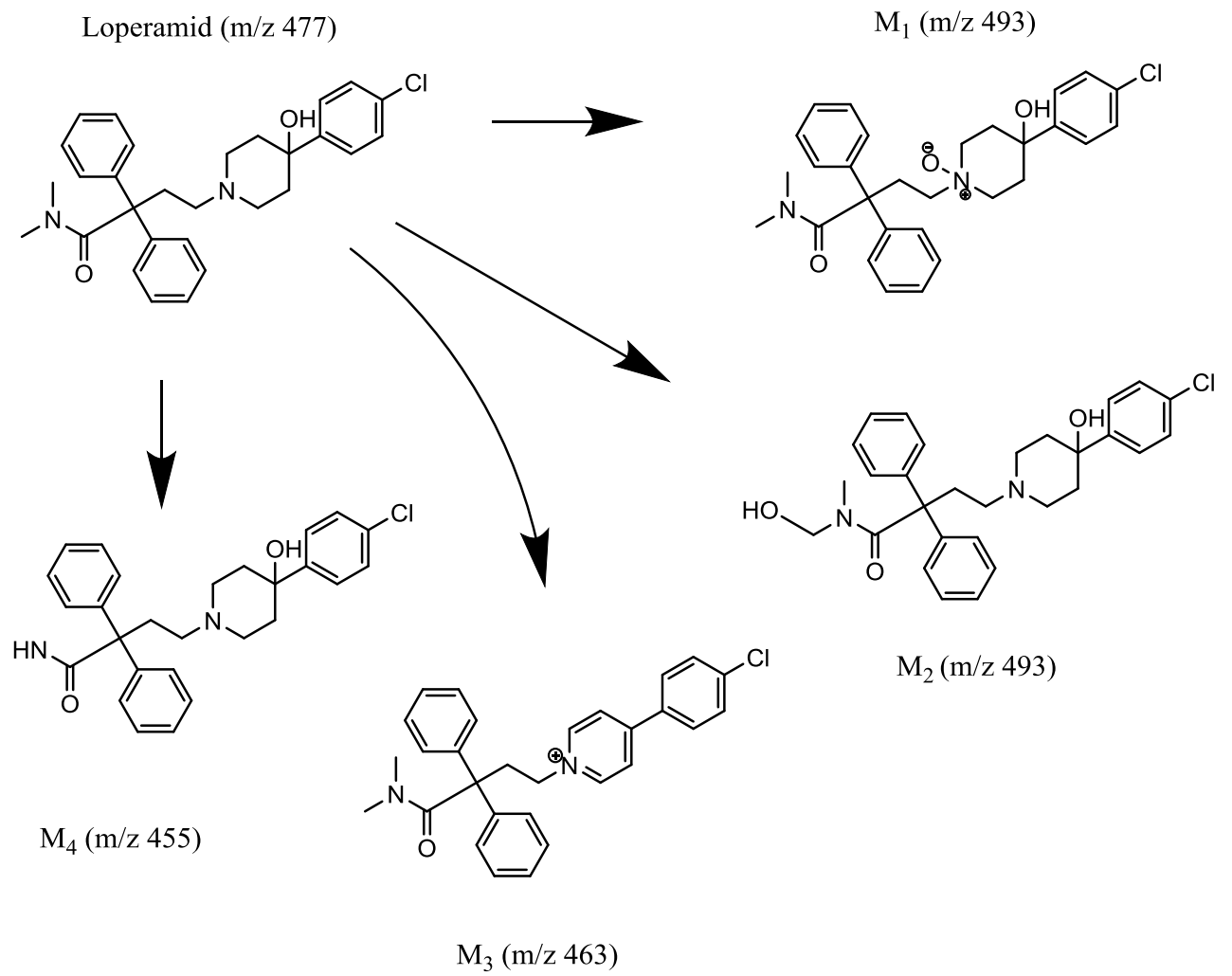
4.3.3 Loperamid

Figur 4.17 viser metabolismeprofilen for loperamid generert ved å bruke levermikrosomer fra rotte.



Figur 4.17: On line monitorering av in vitro metabolisme av loperamid med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

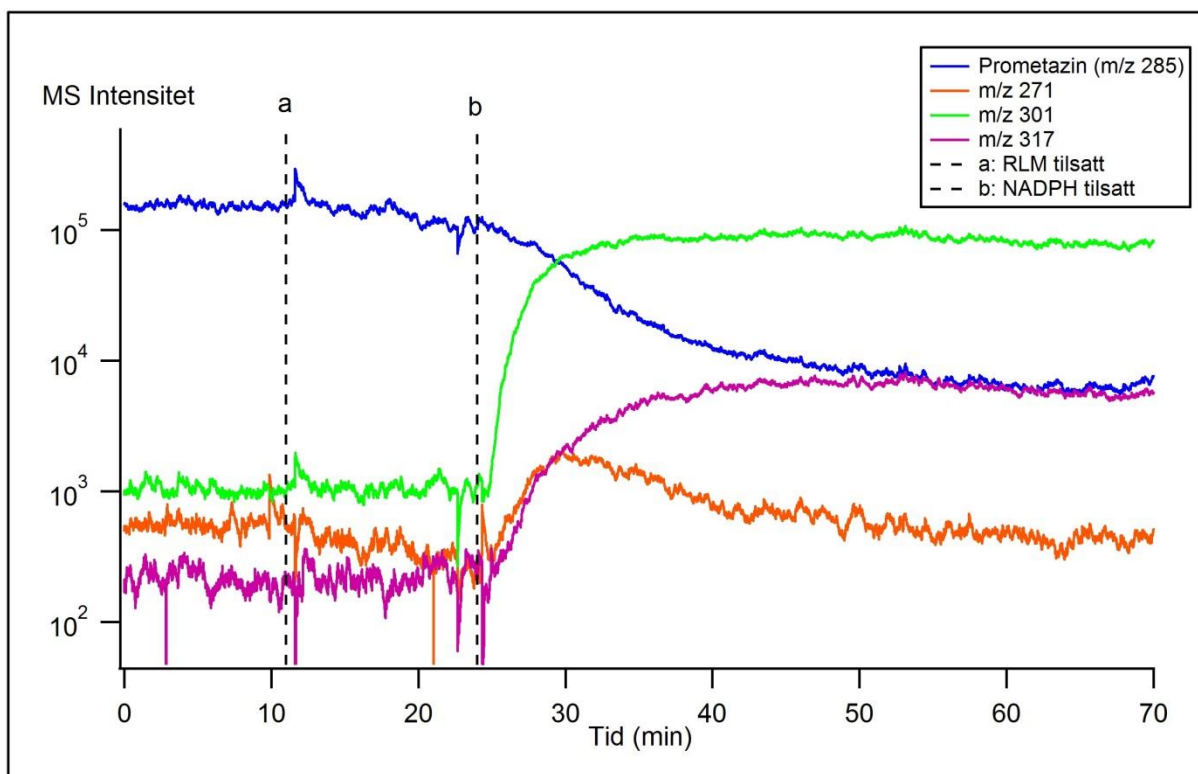
Halveringstiden for loperamid i dette forsøket er beregnet til å være 9,6 min. I et lignende metabolismeforsøk med en EME-probe ble halveringstiden beregnet til å være 20 min (49). I litteraturen er det beskrevet metabolitter av loperamid med m/z- verdier 493, 463 (49,51) og 455 (M_3) (51). Strukturene til disse er vist i figur 4.18, og det antas at metabolittene med disse m/z-verdiene monitorert i dette forsøket er disse. Metabolittene med m/z-verdi 493 er N-oksidert loperamid (M_1) og hydroksyloperamid (M_2) og metabolitten med m/z-verdi 463 er desmetyl-loperamid (M_3). Det ble ikke funnet noen metabolitt med m/z-verdi 471 beskrevet ved litteratursøk. Kurveforløpet til dette stoffet indikerer at det kan være en metabolitt.



Figur 4.18: Strukturene til beskrevne metabolitter av loperamid (49,51).

4.3.4 Prometazin

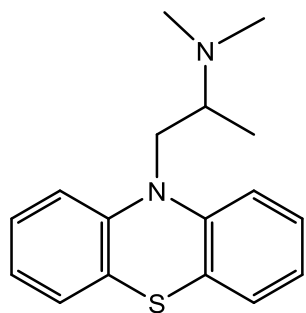
Figur 4.19 viser metabolismeprofilen for prometazin generert ved å bruke levermikrosomer fra rotte.



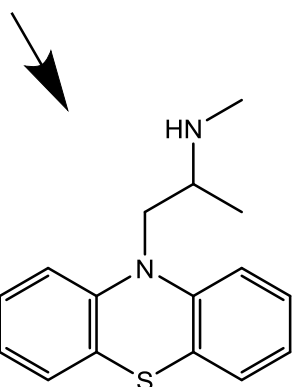
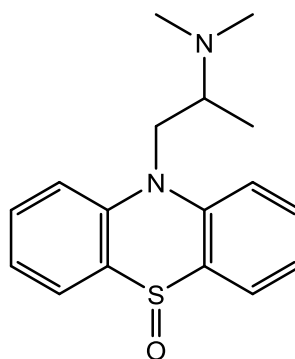
Figur 4.19: On line monitorering av in vitro metabolisme av prometazin med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

Halveringstiden til prometazin i dette forsøket er beregnet til å være 4,8 min. I et tidligere metabolismeforsøk med en EME-probe ble halveringstiden beregnet til å være 4,4 min (13). I litteraturen er der beskrevet metabolitter med m/z-verdier 301 og 271, som henholdsvis er en S-oxidert metabolitt og norprometazin (52). Strukturen for disse er vist i figur 4.20, og det antas at metabolittene med disse m/z-verdiene monitorert i dette forsøket er disse. De to metabolittene er også omtalt i Phenegrans® preparatomtale (53). Stoffet med /z-verdi 317 ble ikke funnet omtalt som metabolitt ved litteratursøk. Stoffets m/z-verdi er 32 amu høyere enn prometazins og 16 amu høyere enn den S-oxiderte metabolitten. Det er tenkelig at det kan være en hydroksylert S-oxidert metabolitt eller dihydroksylert prometazin.

Prometazin (m/z 285)



S-oxidert prometazin (m/z 301)

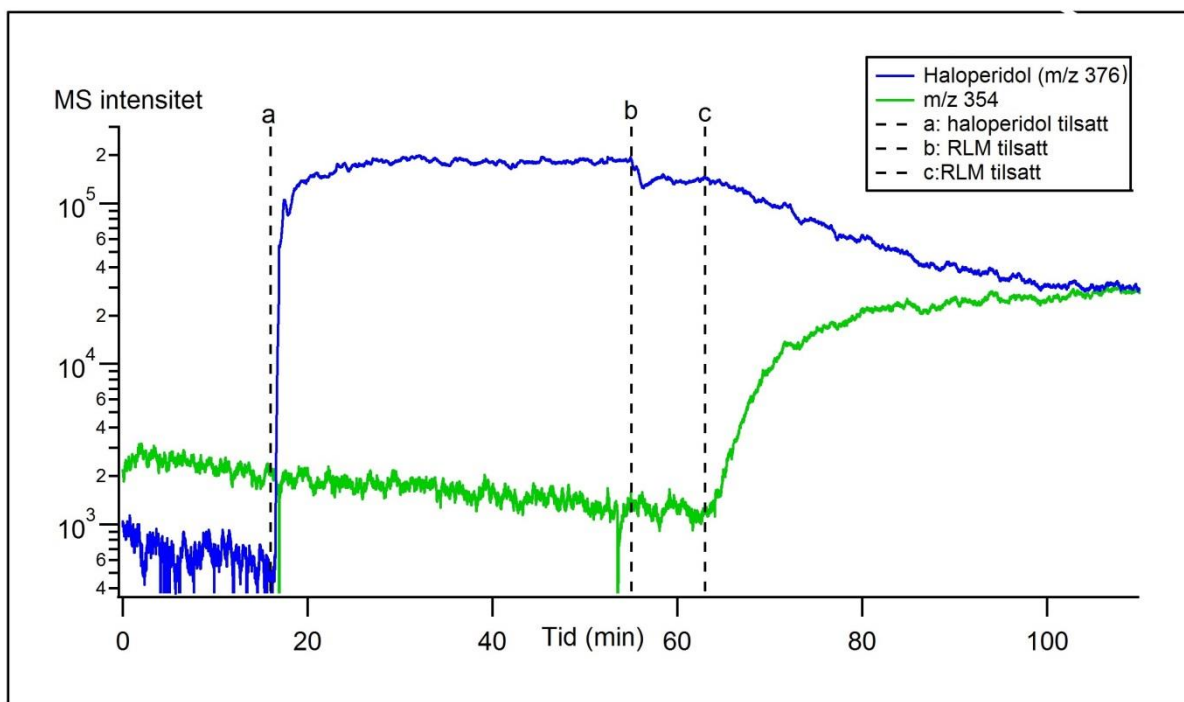


Desmetylprometazin (m/z 271)

Figur 4.20: Struktur av prometazins beskrevne metabolitter (52).

4.3.5 Haloperidol

Figur 4.21 viser metabolismeprofilen for haloperidol generert ved å bruke levermikrosomer fra rotte.

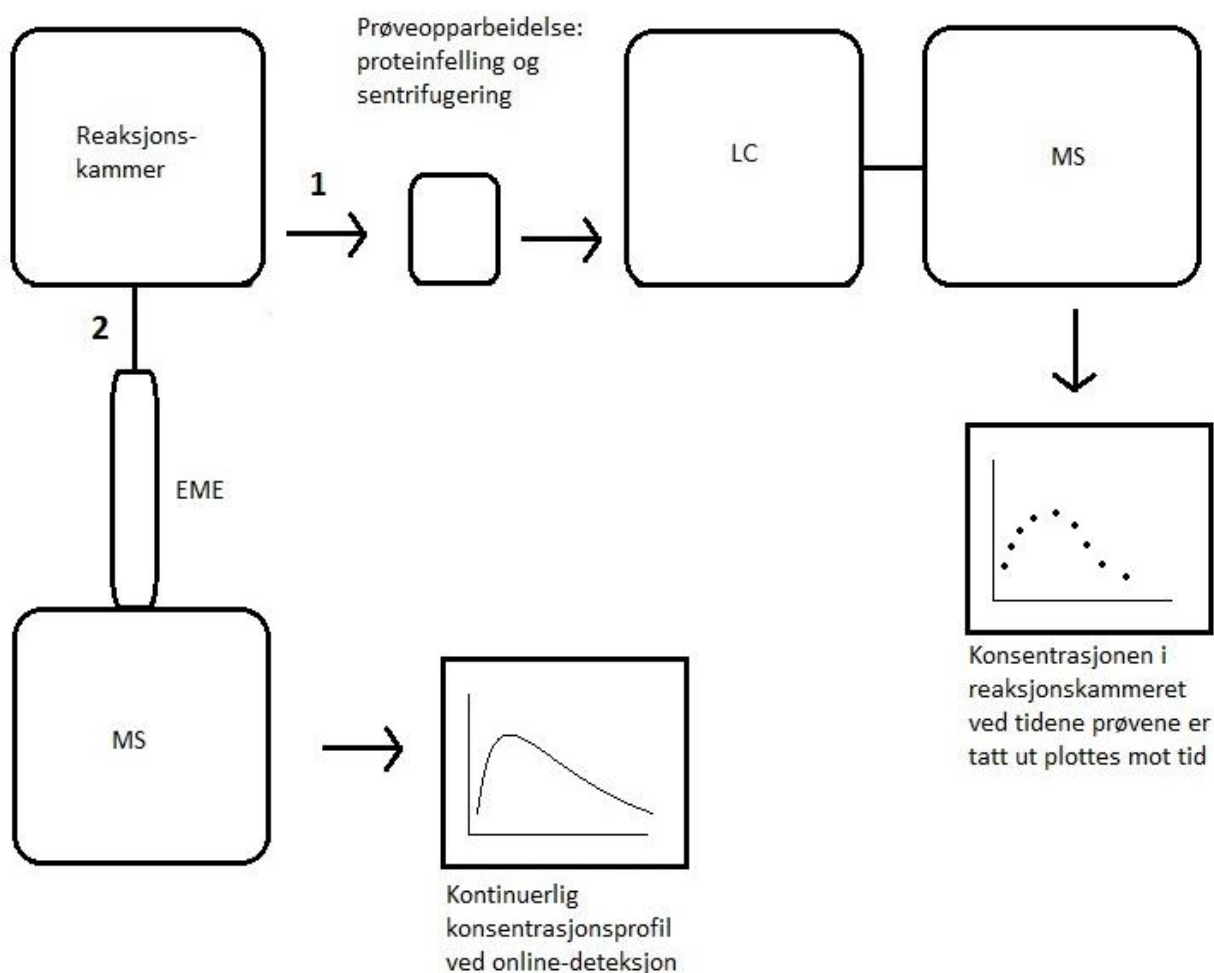


Figur 4.21: On line monitorering av in vitro metabolisme av haloperidol med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS.

Halveringstiden til haloperidol i dette forsøket er beregnet til å være 13,9 min. Haloperidol har ingen aktive metabolitter (54) og det ble ikke funnet informasjon om m/z-verdier for metabolitter av haloperidol ved litteratursøk. Kurveforløpet til stoffet med m/z-verdien 354 indikerer at dette er en mulig metabolitt.

4.4 Resultatene fra EME-ESI-MS sammenlignet med tradisjonell LC-MS-metode

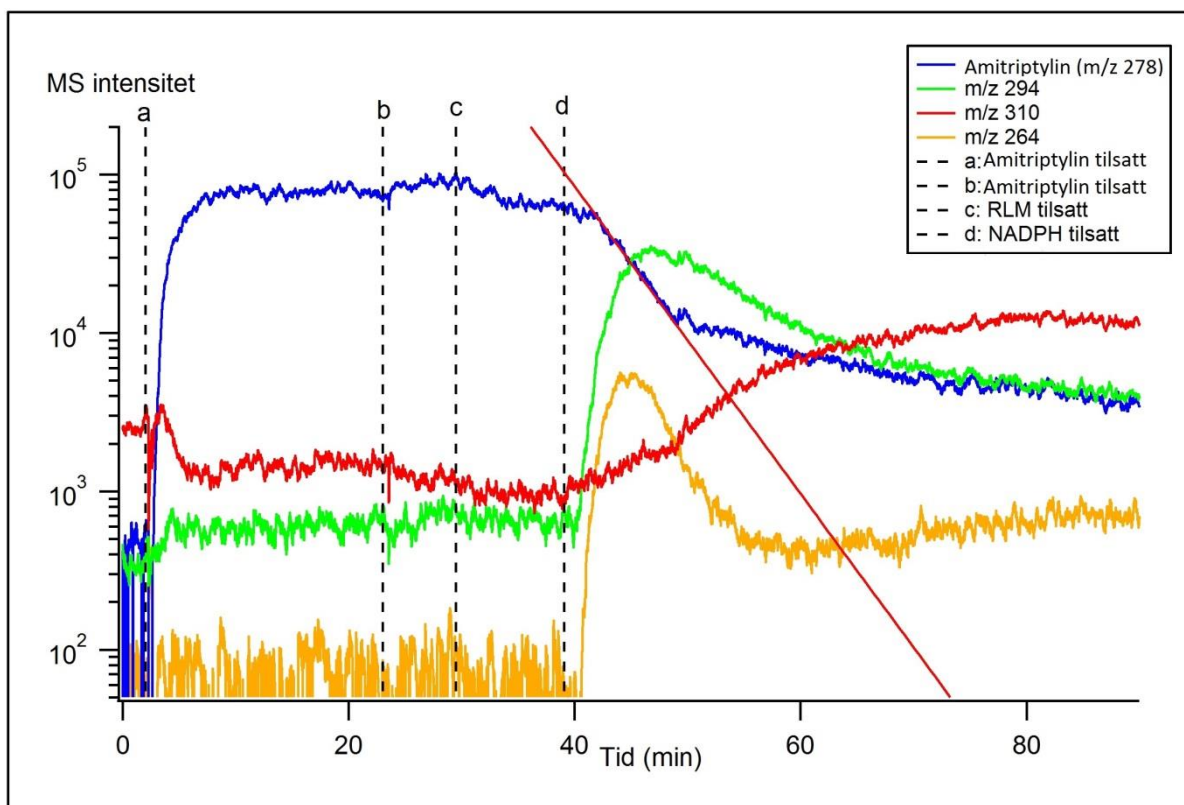
Den tradisjonelle måten å utføre in vitro metabolismestudier er å ta ut prøver ved gitte tider fra reaksjonsløsningen, og analysere dem på LC-MS etter prøveopparbeidelse som består av proteinfelling og sentrifugering. I figur 4.22 er den tradisjonelle metoden merket som 1. For å undersøke om EME-systemet gir samme resultat som den tradisjonelle metoden ble det tatt ut prøver fra reaksjonskammeret underveis i in vitro- metabolismen, samtidig som det som foregikk i reaksjonskammeret ble detektert online. EME-ESI-MS-metoden som er merket som 2 i figur 4.22



Figur 4.22: Skisse av forskjellen på [1] tradisjonell analysemetode og [2] EME-MS.

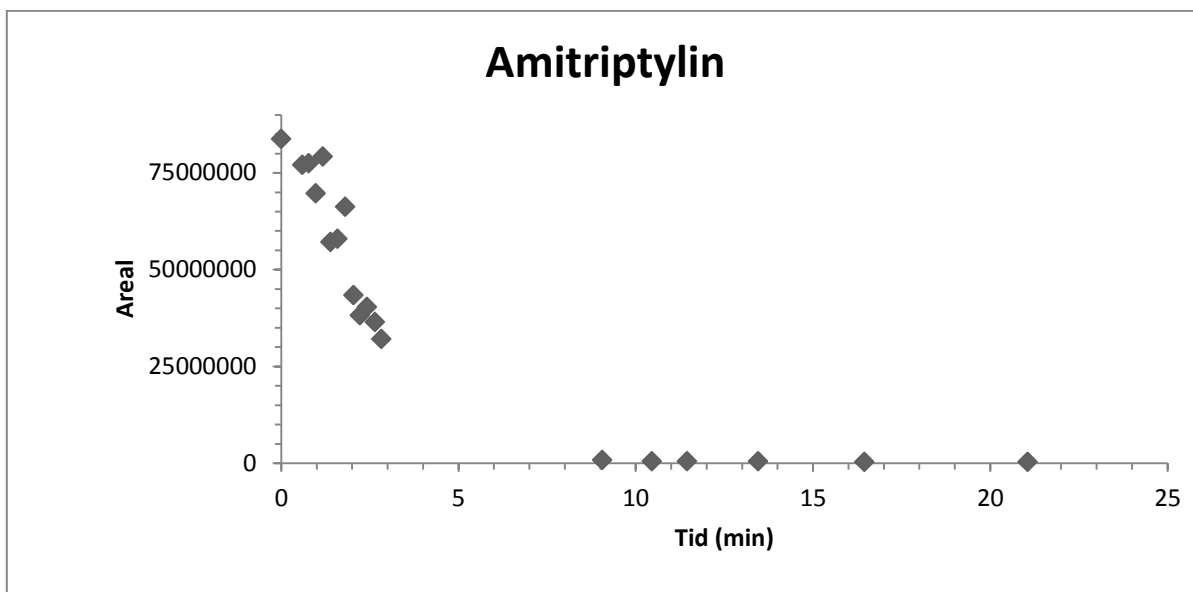
4.4.1 In vitro-metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer

Figur 4.23 viser in vitro metabolismeprofil fra EME-ESI-MS av amitriptylin generert ved bruk av RLM. En logaritmisk tilpasningskurve som kan brukes til beregning av halveringstiden er tegnet inn i rødt. Dette er de samme dataene som i figur 4.12, og halveringstiden er beregnet til å være 2,8 min.



Figur 4.23: On line monitorering av in vitro metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS. Den røde linjen er en logaritmisk tilpasningskurve som kan brukes til å beregne halveringstiden. Samme datafil som i figur 4.12.

Prøvene som ble tatt ut underveis til LC-MS-analyse ble behandlet på samme måte som ved tradisjonelle metode. Prøvene ble felt med likt volum acetonitrill og fryst ned før supernatanten ble analysert med LC-MS. Figur 4.24 viser metabolismeprofilen som ble funnet ved å analysere prøvene som ble tatt ut underveis på tradisjonell måte.



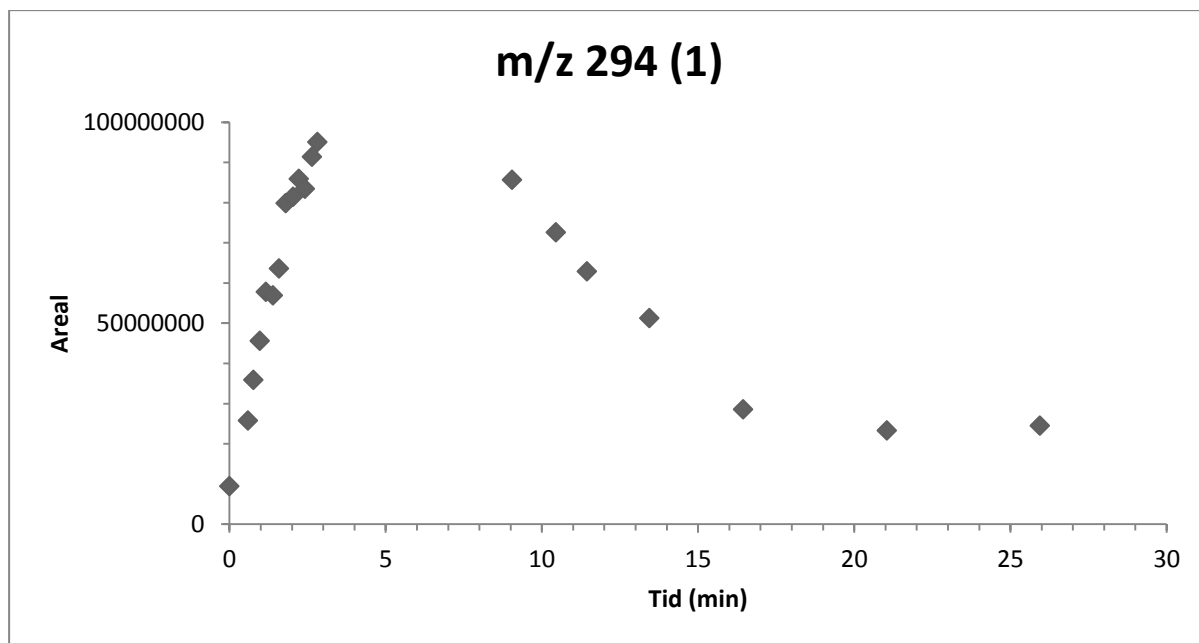
Figur 4.24: In vitro metabolismeprofil av amitriptylin ved tradisjonell LC-MS analysemetode etter in vitro metabolisme ved bruk av RLM.

Halveringstiden funnet fra EME-MS-dataene er beregnet til å være 2,8 min. Ved å bruke tallene generert ved å bruke den tradisjonelle metoden ble halveringstiden beregnet til å være 2 min. De to halveringstidene er av samme størrelsesorden og rask metabolisme er observert ved bruk av begge metodene. Forskjellen på de to halveringstidene kan i tillegg til eksperimentell usikkerhet skyldes analyttens oppholdstid i væskemembranen, som er det hastighetsbestemmende trinnet i ekstraksjonen (36). Det antas at oppholdstiden øker ved økt membrantykkelse. Det er også blitt observert forsinkelse i systemet i responstid-forsøket (figur 4.11).

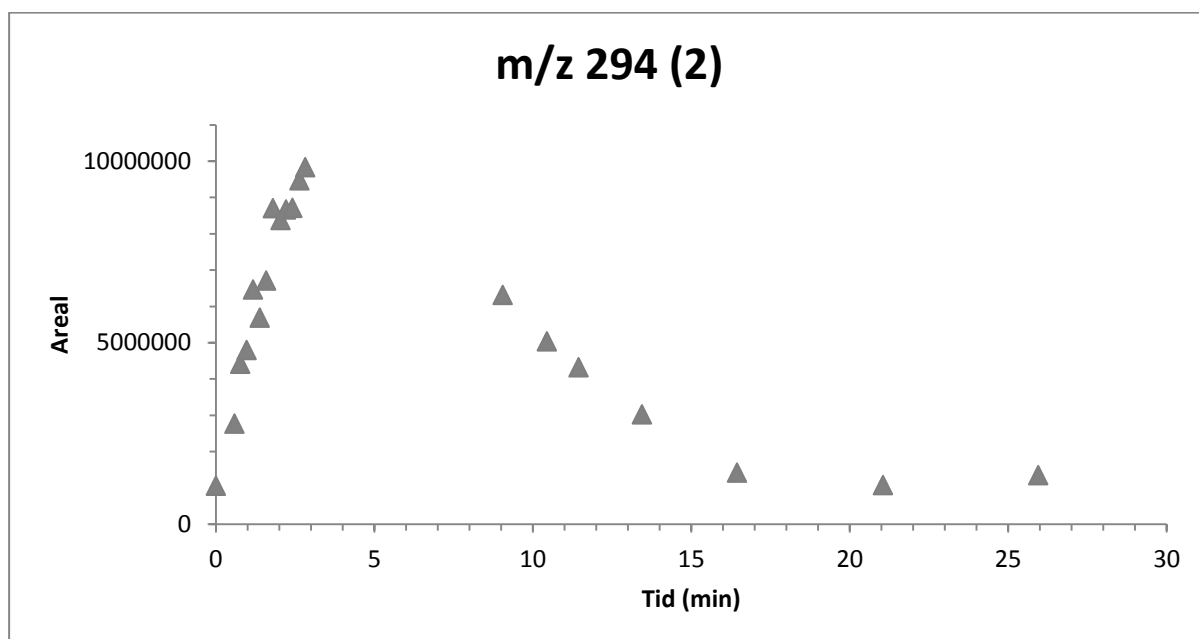
I konsentrasjonsprofilene for amitriptylin (figur 4.24) og amitriptylins metabolitter (figur 4.25-4.35) mangler det noen punkter i et tidsrom på omtrent 5 minutter for å få en fullstendig og god profil. I dette tidsrommet ble det ikke tatt ut prøver fra reaksjonskammeret. Dette illustrerer en svakhet ved den tradisjonelle analysemetoden, hvor kontinuerlig prøveuttak er nødvendig for å få fullstendige konsentrasjonsprofiler.

LC-MS-analysen av prøveuttakene fra in vitro metabolisme av amitriptylin viste at hydroksylering kan skje flere steder på legemiddelmolekylet. Stoffene med m/z -verdi 294 er stereoisomere av hydroksyamitriptylin og i LC-MS-analysen ble det detektert fire forskjellige stereoisomere av hydroksyamitriptylin (figur 4.25- 4.28). Figur 4.29 viser

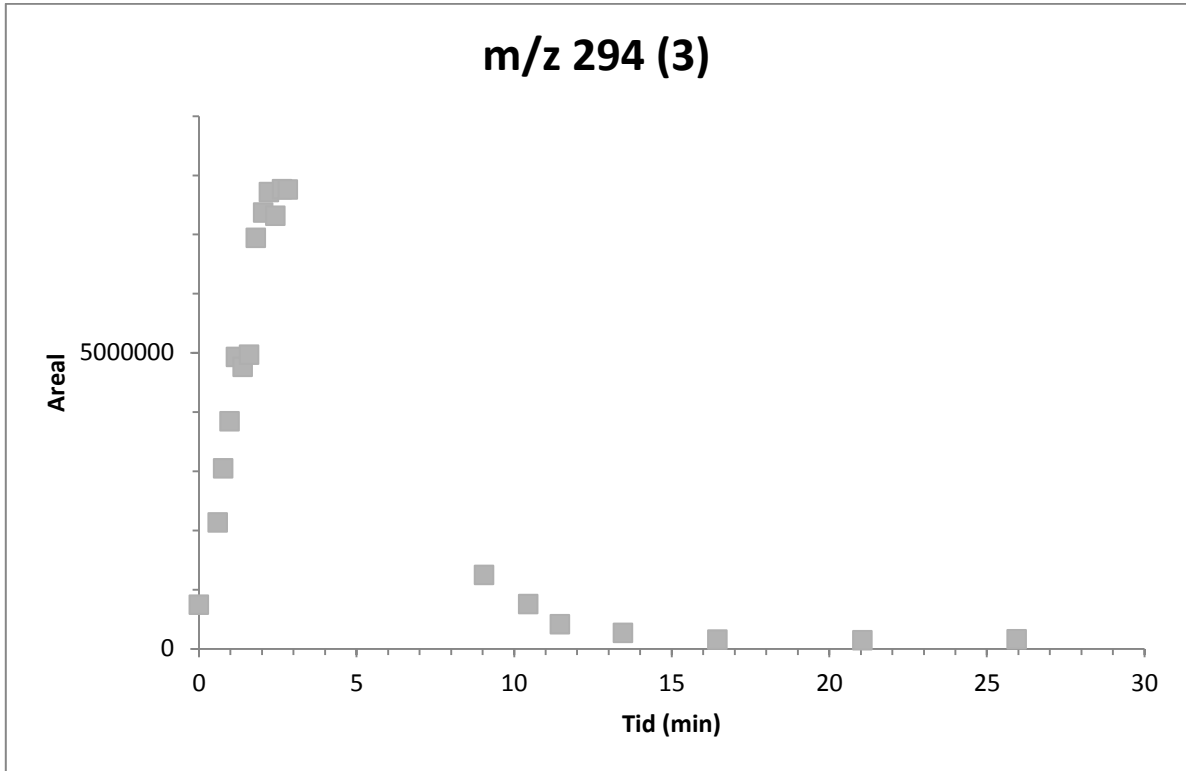
konsentrasjonsprofilen for de fire stereoisomerene summert, og kan sammenlignes med konsentrasjonsprofilen generert ved EME-ESI-MS for m/z 294 i figur 4.23.



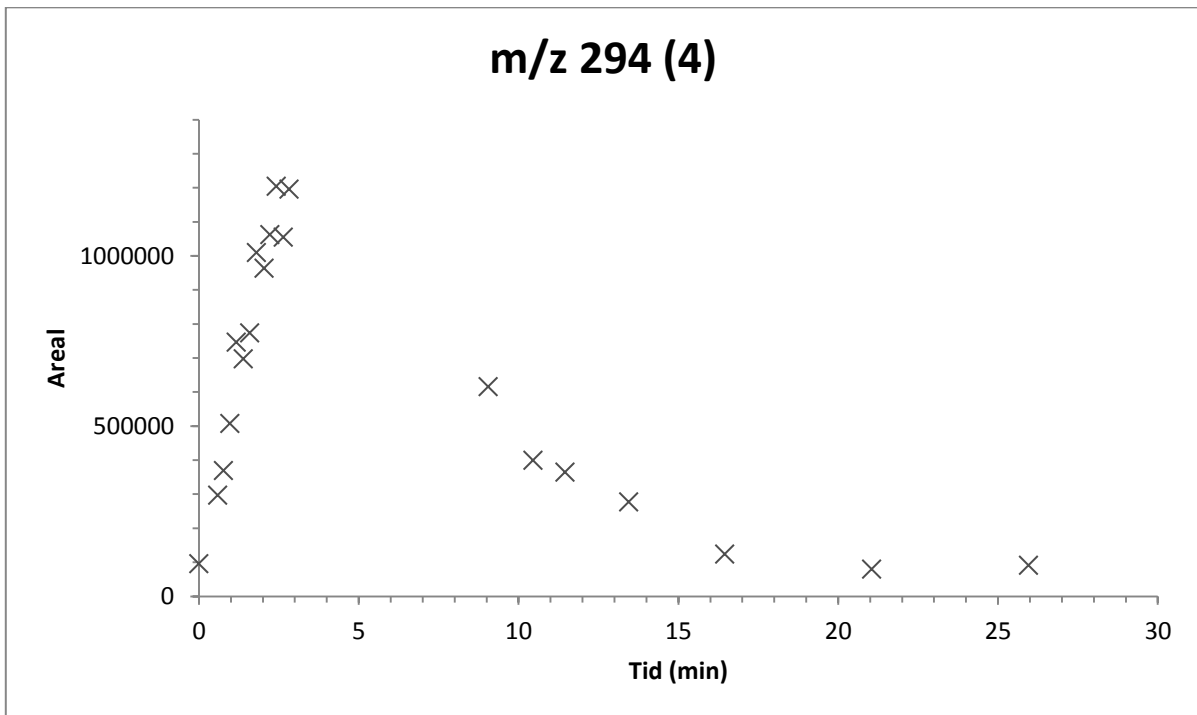
Figur 4.25: Konsentrasjonsprofil for en av fire stereoisomere av hydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



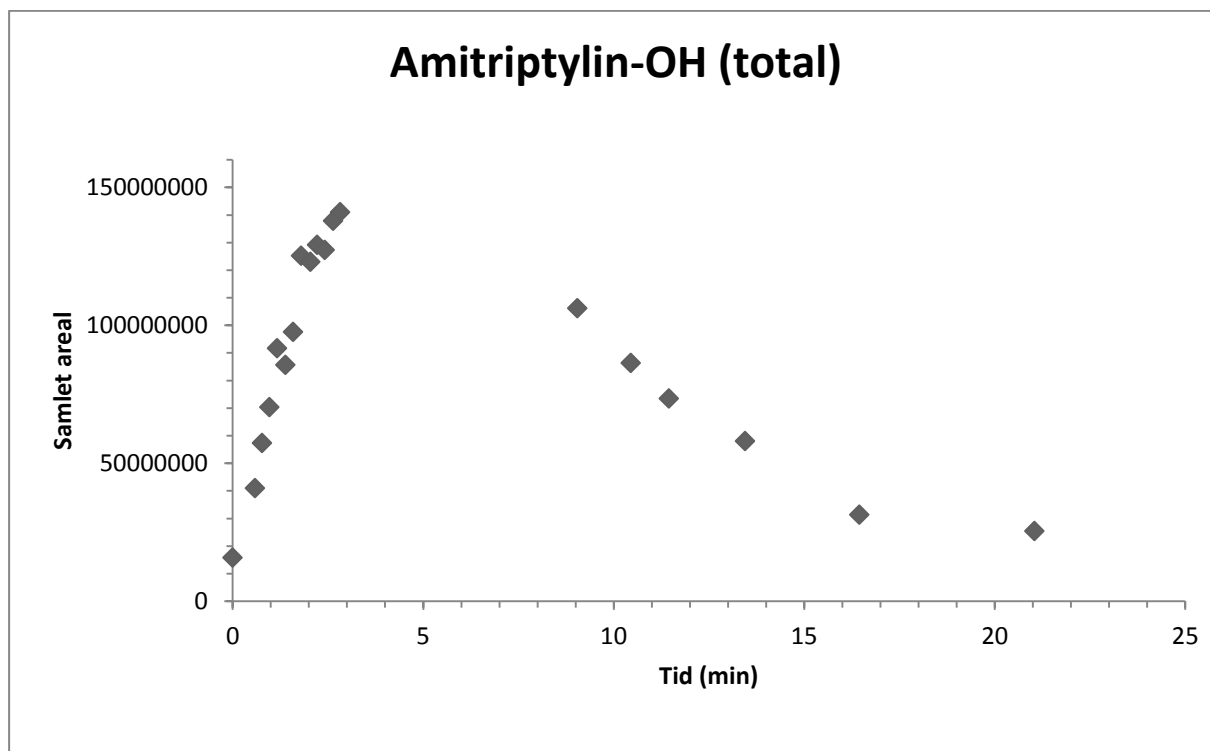
Figur 4.26: Konsentrasjonsprofil for en av fire stereoisomere av hydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



Figur 4.27: Konsentrasjonsprofil for en av fire stereoisomere av hydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



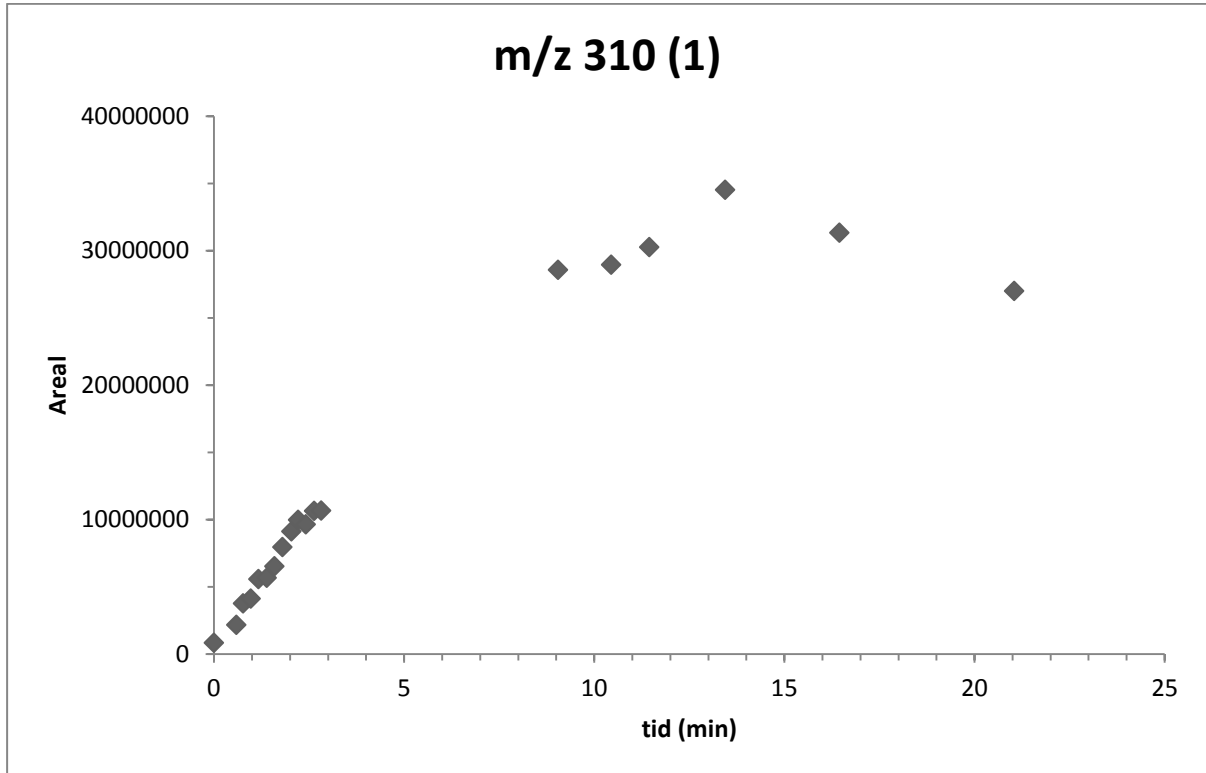
Figur 4.28: Konsentrasjonsprofil for en av fire stereoisomere av hydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



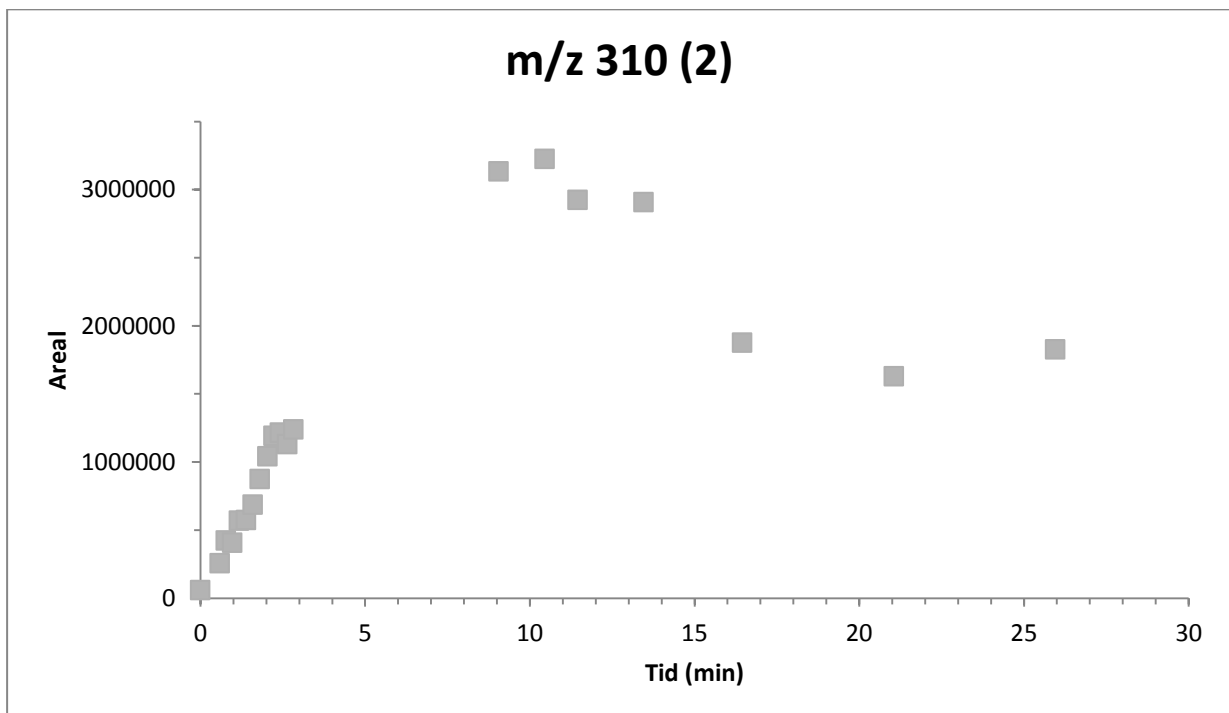
Figur 4.29: Konsentrasjonsprofil for summen av de fire stereoisomere av hydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.

Ved begge metodene ble det detektert en rask stigning og en litt langsommere nedgang i signalet for m/z 294. Tiden et tok til signaltoppen var nådd var av samme størrelsesorden i metodene. Figur 4.29 viser at signalet nærmet seg startpunktet for signalene ved LC-MS-metoden. I konsentrasjonsprofilen generert ved EME-ESI-MS tar det lenger tid, noe som kan skyldes den tidligere omtalte forsinkelsen i membranen.

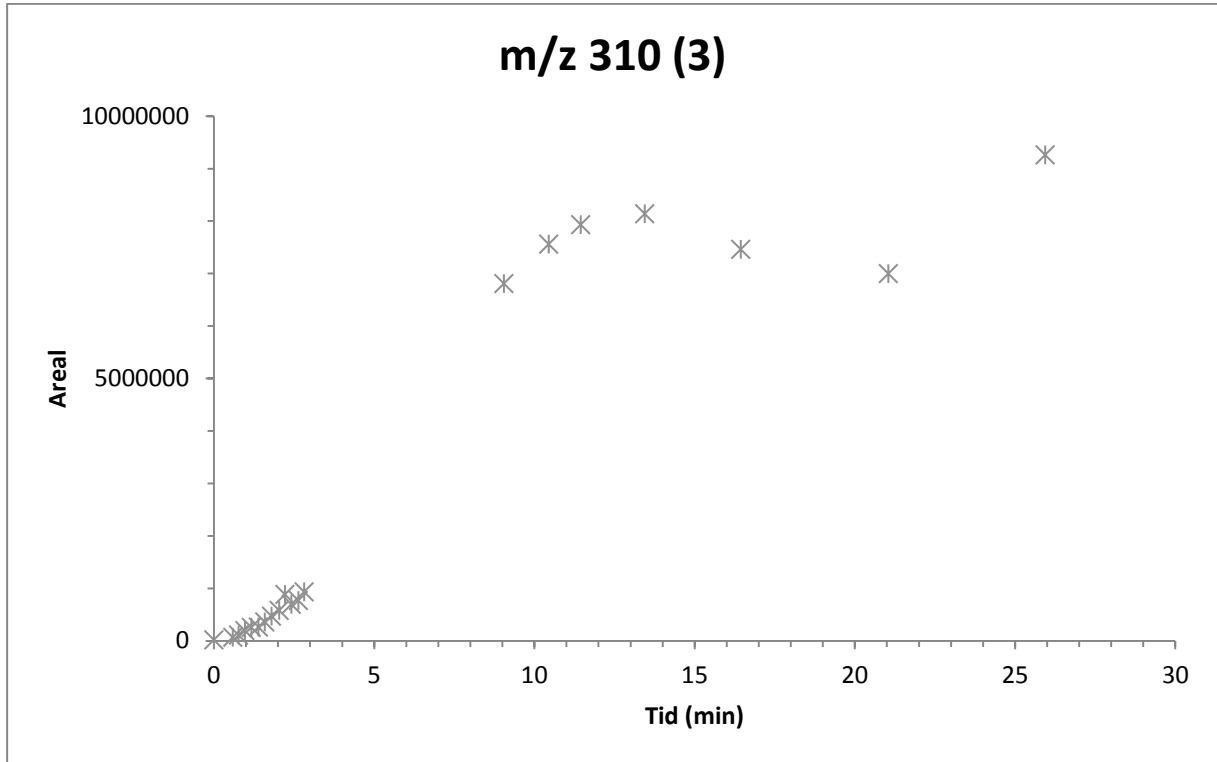
Stoffene med m/z -verdi 310 er stereoisomere av dihydroksyamitriptylin og LC-MS-analysen detekterte fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin (figur 4.30-4.34). Figur 4.35 viser konsentrasjonsprofilen av de fem stereoisomerene av dihydroksyamitriptylin summert og kan sammenlignes med konsentrasjonsprofilen generert ved EME-ESI-MMS for m/z 310 i figur 4.23.



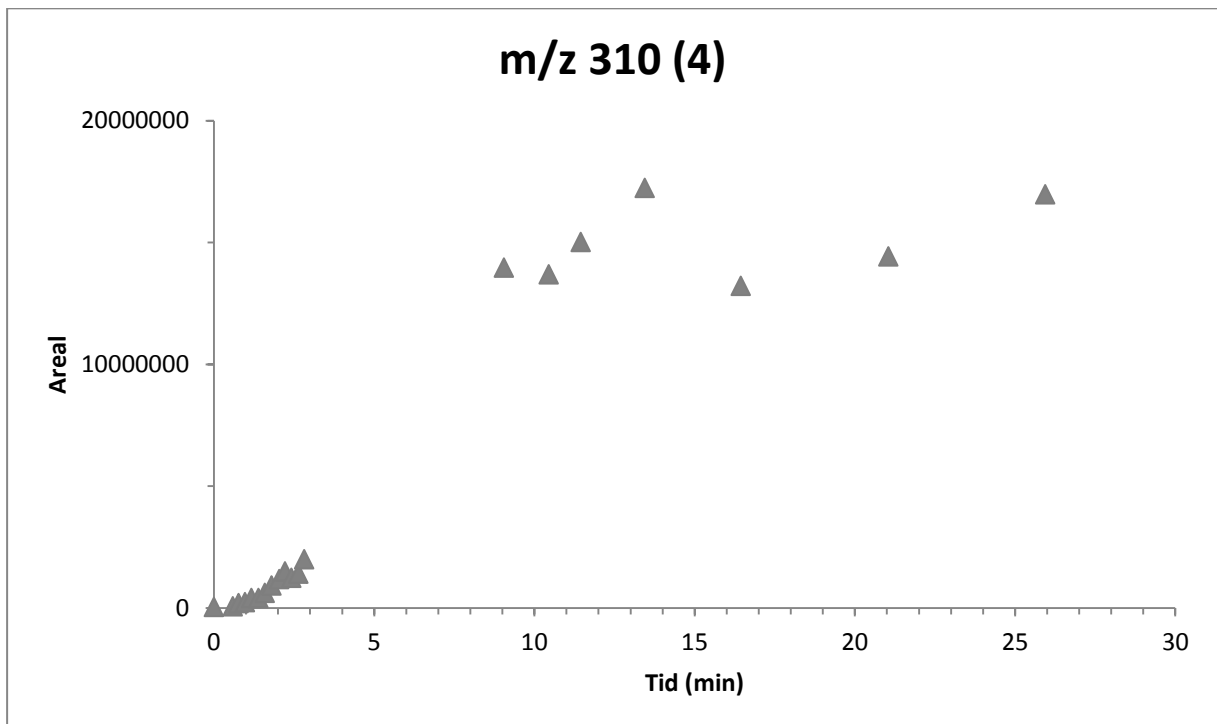
Figur 4.30: Konsentrasjonsprofil for en av fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



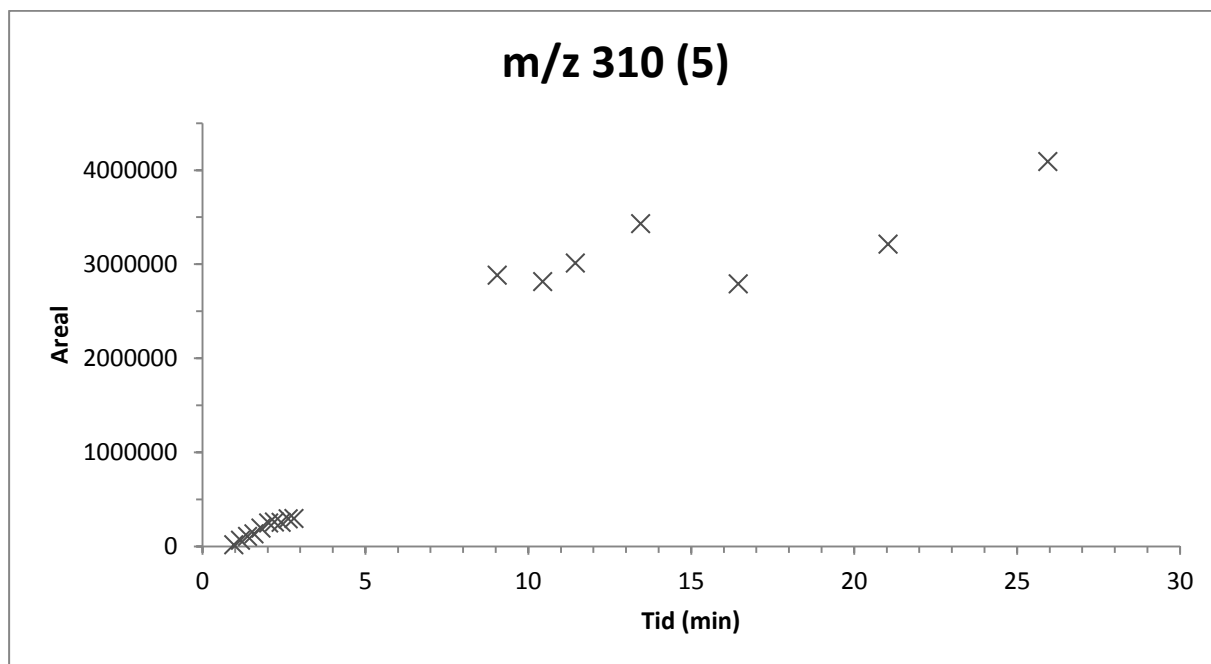
Figur 4.31: Konsentrasjonsprofil for en av fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



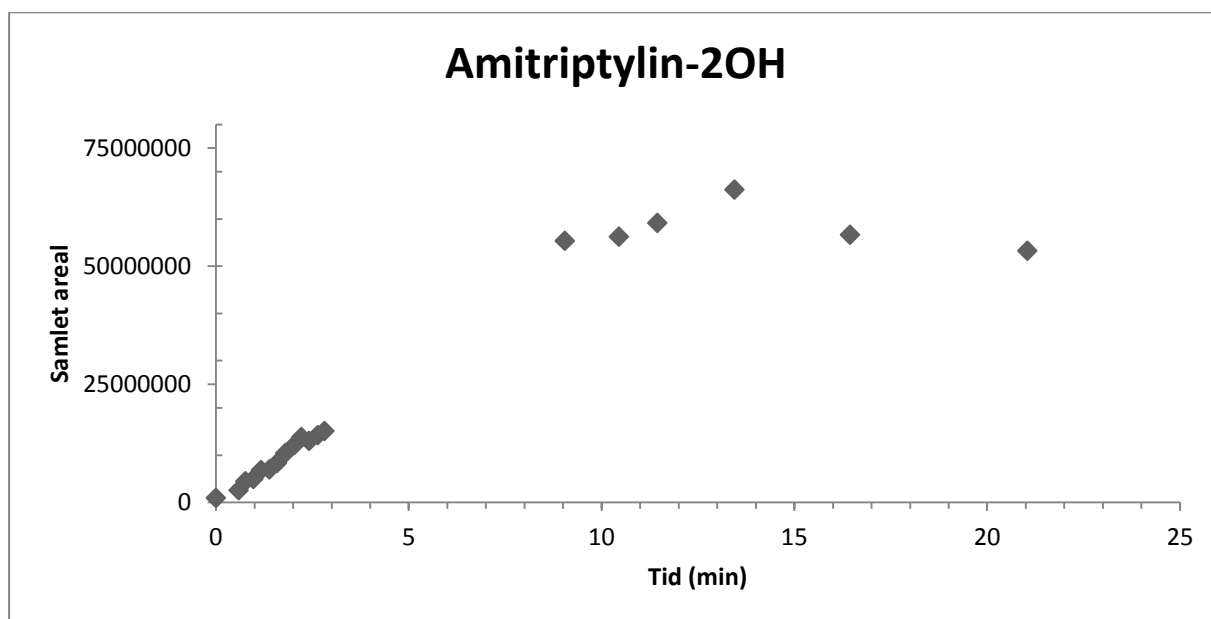
Figur 4.32: Konsentrasjonsprofil for en av fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



Figur 4.33: Konsentrasjonsprofil for en av fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



Figur 4.34: Konsentrasjonsprofil for en av fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.



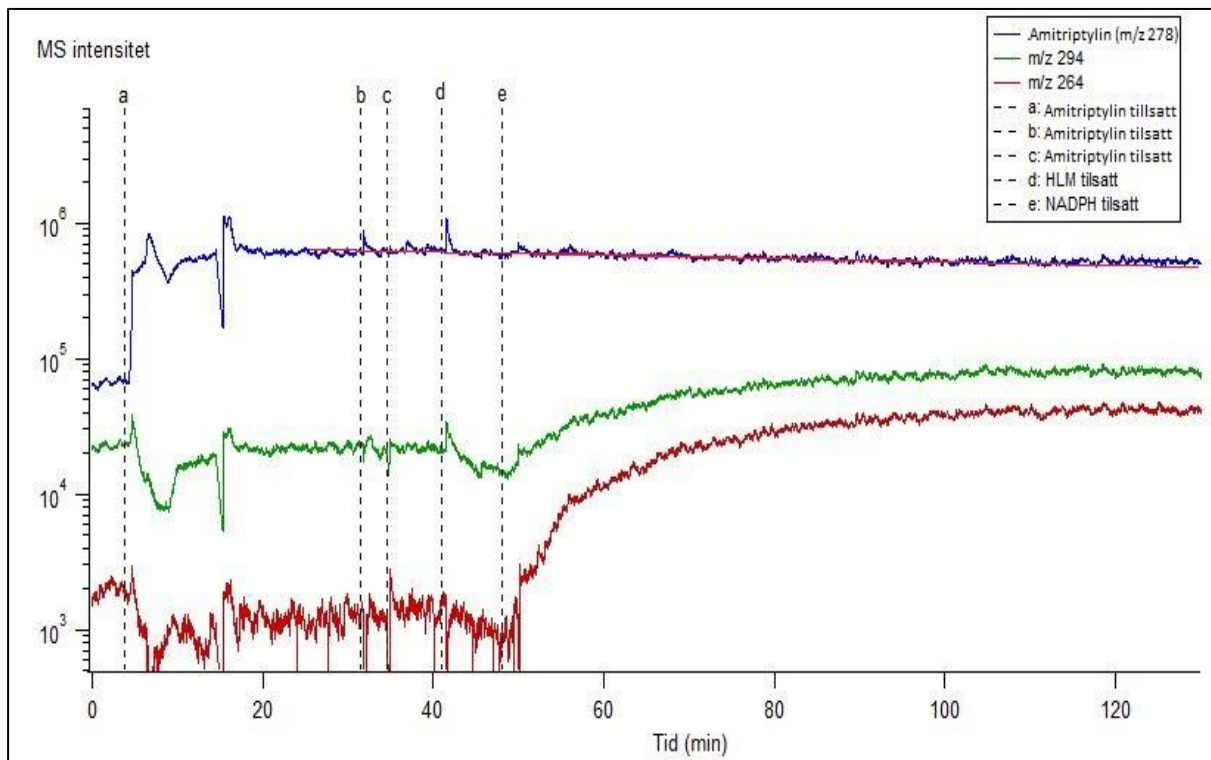
Figur 4.35: Konsentrasjonsprofil for summen av de fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin generert ved tradisjonell LC-MS-analyse etter in vivo metabolisme av amitriptylin med rottelevermikrosomer.

Den summerte konsentrasjonsprofilen for de fem stereoisomere av dihydroksyamitriptylin ser ut til å ha samme tendens som den funnet ved EME-ESI-MS-analyse.

Det ble av uklare årsaker ikke detektert noen stoffer med m/z-verdi 264 ved LC-MS-analyse.

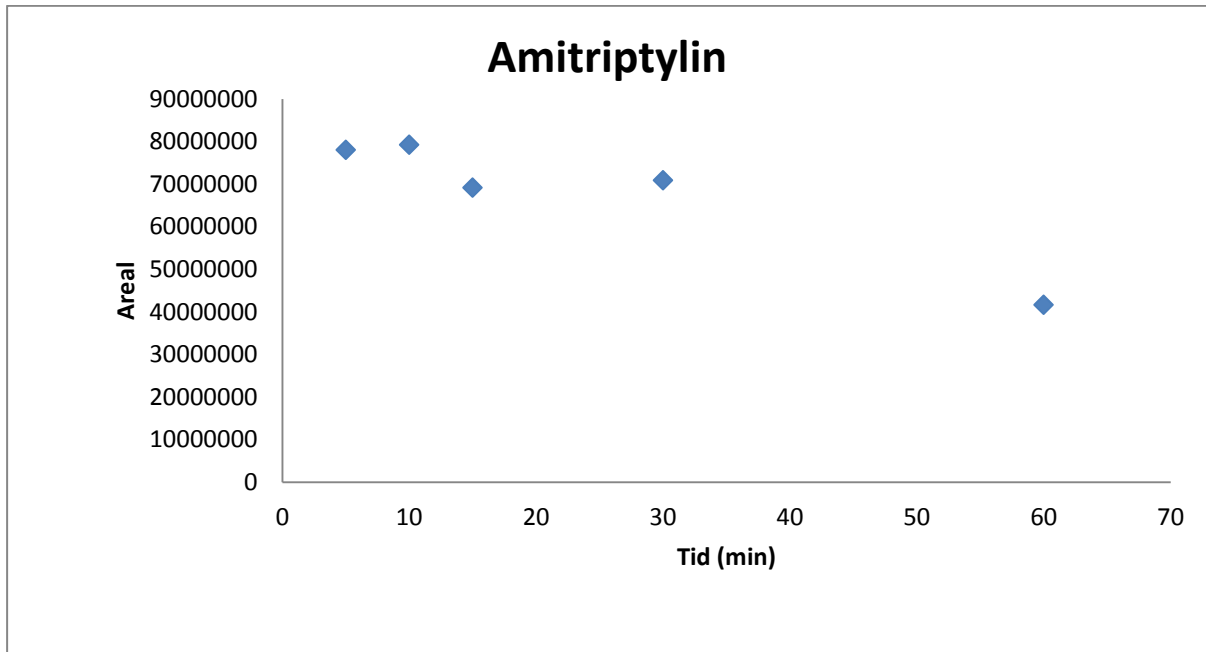
4.4.2 In vitro- metabolisme av amitriptylin med humane levermikrosomer

Figur 4.36 viser in vitro metabolismeprofil fra EME-ESI-MS av amitriptylin generert ved bruk av HLM. En logaritmisk tilpasningskurve som kan brukes til beregning av halveringstiden er tegnet inn i rødt. Dataene i denne figuren er de samme som i figur 4.13.



Figur 4.36: On line monitorering av in vitro metabolisme av amitriptylin med humane levermikrosomer ved hjelp av EME-ESI-MS. Den røde linjen er en logaritmisk tilpasningskurve som kan brukes til å beregne halveringstiden. Samme datafil som i figur 4.14.

Figur 4.37 viser metabolismeprofilen som ble funnet ved å analysere prøvene som ble tatt ut underveis på tradisjonell måte.



Figur 4.37: In vitro metabolismeprofil av amitriptylin ved tradisjonell LC-MS analysemetode etter in vitro metabolisme ved bruk av HLM.

Halveringstiden beregnet fra EME-MS-dataene er 105,3 min. Ved å bruke tallene generert ved å bruke den tradisjonelle analysemetoden ble halveringstiden beregnet til å være 66,6 min. Begge analysemetodene ga halveringstider som er betydelig lengre ved bruk av HLM enn ved bruk av RLM. Prøveuttakene til LC-MS-analysen ble gjort ved tidene de vanligvis blir gjort ved i tradisjonelle metabolismestudier (28) og konsentrasjonskurven inneholder derfor en begrenset mengde punkter. Forskjellen i halveringstid for de to systemene kan tyde på forsinkelse over membranen.

5 Konklusjon

Et EME-system ble konstruert, optimert og koblet til ESI-MS. EME-ESI-MS-systemet ble brukt til å monitere in vitro legemiddelmetabolisme online av fem basiske legemidler. Metabolismereaksjonene ble katalysert av enzymer fra levermikrosomer og reaksjonen foregikk i et reaksjonskammer som det kontinuerlig ble sugd reaksjonsløsning fra og forbi væskemembranen. Legemidlene og legemidlenes hydrofobe metabolitter ble ekstrahert over væskemembranen til akseptorløsningen, som ble analysert ved ESI-MS. Dermed ble endringene i konsentrasjon av legemiddelet og metabolittene i reaksjonskammeret kontinuerlig monitorert. Væskemembranen ekskluderer blant annet salter og proteiner og derfor kan ekstrakter, selv fra komplekse biologiske prøver, analyseres på MS uten videre prøveopparbeidelse.

Systemet som ble laget og prøvd ut i dette arbeidet hadde bevegelig donor- og akseptorløsning, slik som i chip-systemet. Dermed ble ikke den metabolske kinetikken påvirket av ekstraksjonen, slik den ble i probe-oppsettet. I tillegg var væskemembranen lettere tilgjengelig enn den var i chip-oppsettet. Det gjør det enklere å sette opp systemet på nytt og å vedlikeholde og skifte væskemembranen. Systemet ble lagd av vanlige deler uten bruk av spesialutstyr, noe som gjør det mulig for andre å sette opp systemet og reprodusere våre data. Optimeringsforsøkene viste at systemet oppførte seg som forventet utfra tidligere forsøk og teoretiske modeller for EME. Stabilitetsforsøkene viste at oppsettet var stabilt over noen timer, og at flere ekstraksjoner kunne utføres på samme membran. Oppsettet kunne også kobles til MS og brukes til å monitorere metabolske reaksjoner online.

I flere forsøk ble det observert en forsinkelse over membranen. Det kan skyldes lang oppholdstid i den organiske fasen for analyttene, altså at det hastighetsbestemmende trinnet blir fremtredende i dette oppsettet. Ved å bruke en membran som er tynnere vil denne oppholdstiden reduseres, og ekstraksjonen vil skje raskere. Online-bildet vil dermed komme enda nærmere virkeligheten av hva som skjer i reaksjonskammeret til enhver tid. En kombinasjon av tynne membranen fra chip-oppsettet og det enkle oppsettet fra proben og dette arbeidet, samtidig som begge fasene er mobile vil være en måte å komme rundt problemene som til nå har oppstått. Et system som har en tynn, lett tilgjengelig membran med høy ekstraksjonseffektivitet vil kunne monitorere metabolismereaksjoner online enda bedre enn dette systemet gjorde.

Litteraturliste

1. Pedersen-Bjergaard S, KE Rasmussen. Liquid-Liquid-Liquid microextraction for sample preparation and biological fluids to capillary electrophoresis. *Anal Chem.* 1999;71:2650-2656.
2. Pedersen-Bjergaard S, KE Rasmussen. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibres, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J Chromatogr A.* 2008;1184:132-142.
3. Eibak LE, A Gjelstad, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjergaard. Exhaustive electromembrane extraction of some basic drugs from human plasma followed by liquid chromatography–mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed.* 2012;57:33–38.
4. Jamt RE, A Gjelstad, LE Eibak, EL Øiestad, AS Christophersen, KE Rasmussen. Electromembrane extraction of stimulating drugs from undiluted whole blood. *J Chromatogr A.* 2012;1232:27– 36.
5. Pedersen-Bjergaard S, KE Rasmussen. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids. *J Chromatogr A.* 2006;1109:183-190.
6. Eskandari M, M Eskandaria, Y Yaminib, L Fotouhia, S Seidi. Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field. *J Pharmaceut Biomed.* 2011;54:1173–1179.
7. Petersen NJ, ST Foss, H Jensen, SH Hansen, C Skonberg, D Snakenborg, JP Kutter, S Pedersen-Bjergaard. On-chip electro membrane extraction with online ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal Chem.* 2011;83:44-51.
8. Middelthon-Bruer TM, A Gjelstad KE Rasmussen S Pedersen-Bjergaard. Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs. *J Sep Sci.* 2008;31:753 –759.
9. Balchen M, A Gjelstad, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjergaard. Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane. *J Chromatogr A.* 2007;1152:220-225.
10. Balchen M, L Reubsaet, S Pedersen-Bjergaard. Electromembrane extraction of peptides. *J Chromatogr A.* 2008;1194:143–149.
11. Petersen, NJ, JS Pedersen, NN Poulsen, H Jensen, C Skonberg, SH Hansen, et. al. On-chip electromembrane extraction for monitoring drug metabolism in real time by electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst.* 2012;137:3321–3327.
12. Petersen, NJ, H Jensen, SH Hansen, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjergaard. Drop-to-drop microextraction across a supported liquid membrane by an electrical field under stagnant conditions. *J Chromatogr A.* 2009;1216:1496–1502.
13. Dugstad HB, NJ Petersen, H Jensen, C Gabel-Jensen, SH Hansen, S Pedersen-Bjergaard. Development and characterization of a small electro membrane extraction probe coupled with mass spectrometry for real-time and online monitoring of in vitro drug metabolism. *Anal Bioanal Chem.* 2014;406:421-429.
14. Striglerova L, P Kuban, P Bocek. Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *J Chromatogr A.* 2011;1218:6248– 6255.
15. Rezazadeh M, Y Yamini, S Seidi. Electromembrane extraction of trace amounts of naltrexone and nalmeferne from untreated biological fluids. *J Chromatogr B.* 2011;879:1143–1148.

16. Eibak LE, A Gjelstad, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjerggaard. Kinetic electro membrane extraction under stagnant conditions—fast isolation of drugs from untreated human plasma. *J Chromatogr A*. 2010;1217:5050–5056.
17. Kjelsen IJ, A Gjelstad, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjerggaard. Low-voltage electromembrane extraction of basic drugs from biological samples. *J Chromatogr A*. 2008;1180:1–9.
18. Gjelstad A, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjerggaard. Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. *Anal Bioanal Chem* 2009;393:921–928.
19. Hasheminesab KS, AR Fakhari, A Shahsavani, H Ahmar. A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples. *J Chromatogr A*. 2013;1285:1–6.
20. Basheer C, SH Tan, HK Lee. Extraction of lead ions by electromembrane isolation. *J Chromatogr A*. 2008;1213:14–18.
21. Payan MR, MS Lopez, RF Torres, MV Navarro, MC Mochon. Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater sample. *Talanta*. 2011;85:394–399.
22. Seidi, S, Y Yaminia, A Heydaria, M Moradia, A Esrafilia, M Rezagadeh. Determination of thebaine in water samples, biological fluids, poppy capsule, and narcotic drugs, using electromembrane extraction followed by high-performance liquid chromatography analysis. *Anal Chim Acta*. 2011;701:181– 188.
23. Kiplagat IK., TK Doan, P Kuban, P Bocek. Trace determination of perchlorate using electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. 2011;32:3008–3015.
24. Xu L, PC Hauser, HK Lee. Electro membrane isolation of nerve agent degradation products across a supported liquid membrane followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogra A*. 2008;1214:17–22.
25. Kuban P, L Strieglerova, P Gebauer, P Bocek. Electromembrane extraction of heavy metal cations followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis*. 2011;32:1025–1032.
26. Davarari SS, HR Moazami, AR Keshtkar, MH Banitaba, S Nojavan .A selective electromembrane extraction of uranium (VI) prior to its fluorometric determination in water. *Anal Chim Acta*. 2013;783:74–79.
27. Lee J, F Khalilian, H Bagheri, HK Lee. Optimization of some experimental parameters in the electro membrane extraction of chlorophenols from seawater. *J Chromatogr A*. 2009;1216:7687–7693.
28. Z Zhang, LS Kaminsky. Determination of metabolic rates and enzyme kinetics. In: Zhang D, M Zhu, WG Humphreys, editors. *Drug metabolism in drug design and development*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2008. P. 413-441.
29. Pedersen-Bjergard S, KE Rasmussen. *Legemiddelanalyse*. 2nd edition. Bergen: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS; 2004. P. 232-275.
30. Doig MV, DM Higton. Fundamental Aspects of mass spectrometry. In: Venn RF, editor. *Principles and practice of bioanalysis*. 2nd ed. Boca Raton: Taulor & Francis Group; 2008. P. 193-222.
31. Waters. Common ionization. Cited 12.15.14. Available from: http://www.waters.com/waters/en_NO/Common-Ionization/nav.htm?cid=10073251&locale=en_NO

32. Youdim KA, KC Saunders. A review of LC–MS techniques and high-throughput approaches used to investigate drug metabolism by cytochrome P450s. *J Chromatogr B*. 2010; 878:1326–1336.
33. Shimadzu. Introduction to LC-MS part6. Cited 12.05.14. Available from: <http://www.shimadzu.com/an/lcms/support/intro/lib/lctalk/61/61intro.html>
34. Gjelstad A, S Pedersen-Bjerdaard. Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation. *Bioanalysis*. 2011;3(7):787–797.
35. Seip KF, M Faizi, C Vergel, A Gjelstad, S Pedersen-Bjergaard. Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction—a link to solvent properties. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406:2151–2161.
36. Seip, KF, MH Sønsteby, A Gjelstad, S Pedersen-Bjergaard. Electromembrane extraction: Distribution or electrophoresis?. *Electrophoresis* 2013;34:792–799.
37. Dominguez NC, A Gjelstad, AM Nadalc, H Jensen, NJ Petersen, SH Hansen, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjergaard. Selective electromembrane extraction at low voltages based on analyte polarity and charge. *J Chromatogr A*. 2012;1248: 48– 54.
38. Gjelstad A, KE Rasmussen, S Pedersen-Bjergard. Simulation of flux during electro-membrane extraction based on the Nernst-Planck equation. *J Chromatogr A*. 2007;1174:104-111.
39. Kostianinen R, T Kotiaho, T Kuuranne, S Auriola. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization–mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal Mass Spectrom*. 2003;38:357–372.
40. Fasinu P, PJ Bouie, B Rosenkranz. Liver-based in vitro Technologies for drug biotransformation studies- A review. *Current Drug Metabolism* 2012;13:215-224.
41. Eddershaw PJ, M Dickins. Advances in in vitro drug metabolism screening. *Pharma Sci Technol To*. 1999;2(1):13-19.
42. Ekins S, BJ Ring, J Grace, DJ McRobie-Belle, SA Wrighton. Present and future in vitro approaches for drug metabolism. *J Pharmacol Toxicol*. 2000;44:313-324.
43. Tolonen A., MTurpeinen, O Pelkonen. Liquid chromatography–mass spectrometry in in vitro drug metabolite screening. *Drug Discov Today*. 2009;14(3/4):120-133.
44. Korfmacher AW. Principles and applications of LC–MS in new drug discovery. *Drug Discov Ther*. 2005;10(20): 1357-1367.
45. Castro-Perez JM. Current and future trends in the application of HPLC-MS to metabolite-identification studies. *Drug Discovery Today*. 2007;12(5/6):249-256.
46. Park BK, A Boobis, S Clarke, CE Goldring, D Jones, JG Kenna, et.al. Managing the challenge of chemically reactive metabolites in drug development. *Nat rev drug discov*. 2011;10:292-306.
47. Chemaxon. Cited 22.04.14. Available from: <http://www.chemicalize.org/>
48. Ikke publisert arbeid, Charlotte Gabel-Jensen, Institut for farmaci, Det Sundhedsvidenskabelige Fakultet, Københavns Universitet
49. Dugstad HB. Utvikling og karakterisering av en elektromembranekstraksjonsprobe direkte koblet til massespektrometri:et nytt system for monitorering av in vitro legemiddekketabolisme I sanntid (masteroppgave).Oslo: Universitetet I Oslo; 2013.
50. Wilkins DG, PR Nagasawa, SP Gygi, RL Foltz, DE Rollins. Quantitative Analysis of Methadone and Two Major Metabolites in Hair by Positive Chemical Ionization Ion Trap Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol*. 1996;20:355-361.

51. Kalgutkar AS, HY Nguyen. Identification of an n-methyl-4-phenylpyridinium-like metabolite of the antidiarrheal agent loperamide in human liver microsomes: underlying reason(s) for the lack of neurotoxicity despite the bioactivation event. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;32:943-952.
52. Huang M, J Gao, Z Zhaic, Q Liang, Y Wang, Y Bai, G Luo. An HPLC–ESI-MS method for simultaneous determination of fourteen metabolites of promethazine and caffeine and its application to pharmacokinetic study of the combination therapy against motion sickness. *J Pharmaceut Biomed.* 2012;62:119–128.
53. Sanofi-aventis Norge AS. Phenegran. Updated 23.10.07, cited 12.05.14. Available from: <http://slv.no/ layouts/Preparatomtaler/Spc/0000-02366.pdf>
54. Jansen-Cilag AS. Haldol. Updated 24.20.23, cited 12.05.14. Available from: <http://slv.no/ layouts/Preparatomtaler/Spc/0000-04204.pdf>