

# Parallell ekstraksjon av basiske legemidler over kunstige væskemembraner

Håkon Hanssen Nestande



Masteroppgave i farmasi  
45 studiepoeng

Seksjon for farmasøytisk kjemi  
Faggruppe for legemiddelanalyse

Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2018



# **Parallell ekstraksjon av basiske legemidler over kunstige væskemembraner**

Masteroppgaven ble gjennomført ved Seksjon for farmasøytisk kjemi, Faggruppe for legemiddelanalyse ved Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo i perioden august 2017 til mai 2018.

## **Veiledere**

### **Stig Pedersen-Bjergaard**

Professor ved seksjon for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Universitetet i Oslo

### **Marthe Lid**

Avdelingsingeniør ved seksjon for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Universitetet i Oslo

### **Astrid Gjelstad**

Førsteamanuensis ved seksjon for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Universitetet i Oslo  
Medisinsk fagrådgiver, Antidoping Norge

© Håkon Hanssen Nestande

2018

Parallell ekstraksjon av basiske legemidler over kunstige væskemembraner

Håkon Hanssen Nestande

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

*Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) har siden den første publiserte artikkelen i 2013, vist seg å være en effektiv prøveopparbeidelsesmetode i 96-brønnsformat til ekstraksjon av både sure og basiske legemidler fra plasma. PALME er i en utviklingsfase hvor konseptet er klart til å benyttes på rutinelaboratorier som ønsker mer effektive, mindre tidkrevende og billigere prøveopparbeidelsesmetoder; utstyret som brukes er lett å håndtere og er kommersielt tilgjengelig, men interessen for konseptet må skapes med tanke på bruk i rutinelaboratorier. For å øke interessen rundt PALME, ble det i denne oppgaven forsøkt å utvide dets applikasjonsområde ved å utvikle nye metoder for ekstraksjon av vannløselige og fettløselige vitaminer fra plasma. En generisk PALME-metode kalt *PALME-non-polar basic drugs* (PALME-NPBD) ble også testet på en blanding av 46 legemidler og rusmidler i plasma.

Metodeutviklingen i forbindelse med de vannløselige og fettløselige vitaminene viste seg å være krevende på nåværende kunnskap, og det ble besluttet ikke å fullføre dette arbeidet. Erfaringene er oppsummert i appendiks.

Hovedvekten av arbeidet ble derfor fokusert på PALME-NPBD. Legemidlene og rusmidlene (analyttene) som ble ekstrahert med PALME-NPBD var for det meste monobasiske legemidler med  $\log P > 2$ , men noen zwitterioner og analytter med  $\log P < 2$  ble også tatt med. Analyttene ble ekstrahert fra en blanding av 100  $\mu\text{l}$  plasma, 100  $\mu\text{l}$  vandig løsning av analyttene, 25  $\mu\text{l}$  metanol og 25  $\mu\text{l}$  karbonatbuffer pH 10,4 (donorløsning), gjennom en organisk væske immobilisert i porene i en polyvinylidenfluorid (PVDF)-membran (SLM), og inn i en sur, vandig akseptorløsning av 20 mM maursyre pH 2,5 (akseptorløsning). For å effektivisere ekstraksjonen ble PALME-oppsettet satt på en ristemaskin ved 900 rpm i 45 minutter. Etter ekstraksjon i 45 minutter, ble akseptorløsningene pipettert ut og analysert direkte på *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS)-systemet.

Resultatene fra PALME-NPBD viste at 8 av 46 analytter var innenfor kravene som ble satt til den generiske metoden: i) utbytte  $\geq 40\%$ ; ii) utbytte uavhengig av konsentrasjon; iii)  $r^2 \geq 0,98$  og iv) relativt standardavvik (RSD)  $\leq 20\%$ .

# Forord

Først og fremst vil jeg takke min veileder **Stig Pedersen-Bjergaard** for tildeling av en spennende oppgave og for veiledningen jeg har fått underveis. Tilbakemeldingene har vært gjennomtenkte og velformulerte, og du har alltid kommet med gode råd. Tusen takk for veiledningen og for at du alltid har døren åpen!

Til «alle andre» på avdelingen; takk for at dere har et sosialt og inkluderende miljø som gjør at det er trivelig å være masterstudent!

Jeg vil rette en spesielt stor takk til min andre veileder **Marthe Lid**; du er alltid like blid og imøtekommende. Uansett hvilke problemer jeg har hatt på laben eller spørsmål jeg har fundert på, så har du alltid tatt deg tid til å hjelpe. Du er også den jeg har snakket med om absolutt alt gjennom dette året, og det setter jeg stor pris på. Ingenting er for smått eller for stort til at det kan diskuteres med deg.

**Elisabeth Leere Øiestad**; takk for at du tilbød deg å analysere prøvene mine på OUS sine instrumenter da du hørte at jeg analyserte en tiendedel av det du hadde kapasitet til. Du har brukt mye ekstratid på dette, både tidlige morgener, og sene kvelder (i ferier!), så en stor takk til deg. Oppgaven hadde ikke blitt som den ble uten din hjelp!

Sist, men ikke minst; takk til mine medstudenter Arelí, Camilla, Eirik, Ingrid og Sindre for all tulling på lab, køddingen på masterkontoret og for de få gangene vi faktisk var produktive. Kombinasjonen av dette har gjort året som masterstudent et av de beste på farmasi. En stor takk til dere!

# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	1
1 Innledning.....	2
1.1 Bakgrunn .....	2
1.2 Hensikt.....	4
2 Teori .....	5
2.1 Blod som biologisk matriks .....	5
2.2 Prøveopparbeidelse.....	6
2.2.1 Væske-væske-ekstraksjon .....	6
2.2.2 Væskefase-mikroekstraksjon .....	7
2.2.3 Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME).....	9
2.3 Væskrokromatografi .....	11
2.4 Massespektrometri.....	13
2.4.1 Elektrosprayionisering .....	13
2.4.2 Lineær ionefelle.....	14
2.4.3 Trippel kvadrupol.....	15
3 Eksperimentelt.....	16
3.1 Analytter – fysikalsk-kjemiske egenskaper .....	16
3.2 Kjemikalier .....	17
3.3 Utstyr .....	19
3.4 Løsninger .....	22
3.4.1 Buffere.....	22
3.4.2 Diverse løsninger.....	22
3.4.3 Mobilfaser .....	22
3.4.4 Stamløsninger.....	23
3.4.5 Prøveløsninger.....	24
3.4.6 Eksternstandarder .....	25
3.4.7 Biologisk matriks .....	25
3.5 Instrumentelle betingelser.....	25
3.5.1 Gruppe I.....	26
3.5.2 Gruppe II .....	27
3.5.3 Gruppe III.....	28

3.5.4	Gruppe IV.....	31
3.6	Prosedyre for PALME-NPBD.....	33
3.6.1	Ekstraksjonsmetode.....	33
3.6.2	Ekstraksjonsbetingelser.....	35
3.7	Forsøksoppsett.....	36
3.7.1	PALME-NPBD.....	36
3.7.2	PALME-NPBD med DMSO i akseptorløsningen.....	37
3.8	Vurdering av PALME-NPBD.....	37
3.8.1	Utbytte.....	37
3.8.2	Konsentrasjonsuavhengig utbytte.....	38
3.8.3	Linearitet.....	38
3.8.4	Repeterbarhet.....	38
4	Resultater og diskusjon.....	39
4.1	Utbytte.....	39
4.2	Konsentrasjonsuavhengighet.....	42
4.3	Linearitet.....	44
4.4	Repeterbarhet.....	45
4.5	Polart overflateareal som en forklaringsmodell.....	46
4.6	Preliminær test med DMSO i akseptorløsningen.....	51
5	Konklusjon.....	53
	Litteraturliste.....	54
	Appendiks.....	57



# Forkortelser

H <sub>a</sub>	Alternativhypotese
r <sup>2</sup>	Bestemmelseskoeffisient, "R-squared"
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
DMSO	Dimetylsulfoksid
ESI	Elektrosprayionisering
eV	Elektronvolt
OUS	Oslo Universitetssykehus
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i>
HF-LPME	<i>Hollow fiber-LPME</i> (Hulfiber-LPME)
H	Høydeekvivalenten til en teoretisk plate
kV	Kilovolt
Å <sup>2</sup>	Kvadratångstrøm
LC	<i>Liquid chromatography</i> (væskekromatografi)
LLE	<i>Liquid liquid extraction</i> (væske-væske-ekstraksjon)
LPME	<i>Liquid-phase microextraction</i> (væskefase-mikroekstraksjon)
LOQ	<i>Lower limit of quantification</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i> (massespektrometri)
m/z	Masse-til-ladning-forhold
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
H <sub>0</sub>	Nullhypotese
PALME-NPBD	<i>PALME-non-polar basic drugs</i>
PAMPA	<i>Parallel artificial membrane permeability assay</i>
PALME	<i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>
r	Pearsons korrelasjonskoeffisient
PSA	<i>Polar surface area</i> (polart overflateareal)
PP	Polypropylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PPT	<i>Protein precipitation</i> (proteinfelling)
RF	Radiofrekvens
RSD	Relativt standardavvik
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
α	Signifikansnivå, alfa
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> (fast-fase-ekstraksjon)
SLM	<i>Supported liquid membrane</i> (organisk væskemembran)
MS/MS	Tandem massespektrometri
TOA	Trioktylamin
UHPLC	<i>Ultrahigh-pressure liquid chromatography</i>
R	Utbytte
V	Volt
TDM	<i>Therapeutic drug monitoring</i> , terapikontroll
Alfa-PVP	Alfa-pyrrolidinopentiofenon
MDPV	Metylendioksyprovaleron
SLE	<i>Supported liquid extraction</i>
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> (fast-fase mikroekstraksjon)
mbar	Millibar

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Identifisering og kvantifisering av legemidler i biologiske medium kalles bioanalyse og er nødvendig innen blant annet legemiddelutvikling, terapikontroll og rus- og dopinganalyser [1]. Bioanalyse innebærer både bearbeidningen av de biologiske prøvene (prøveopparbeidelse) og analysen av disse prøvene. Prøveopparbeidelsen må gjøres på biologiske prøver siden disse ofte er komplekse og inneholder andre komponenter (matrikskomponenter) enn legemidlene man er interessert i. Uten en prøveopparbeidelse kan matrikskomponentene skade analyseinstrumentet og gi legemidlene redusert eller økt signal i *liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS)-analysen som kan føre til feil i kvantifiseringen av legemidlene [2].

En prøveopparbeidelsesmetode som fjerner så mange matrikskomponenter som mulig og gjør prøven så ren som mulig er derfor viktig, særlig i rus- og dopinganalyser hvor resultatene kan bestemme om en person straffedømmes eller ikke. Noen av prøveopparbeidelsesmetodene som er mye i bruk i bioanalyse er *protein precipitation* (PPT, proteinfelling), *solid-phase extraction* (SPE, fast-fase-ekstraksjon) og *liquid-liquid extraction* (LLE, væske-væske-ekstraksjon) [3]. Proteinfelling brukes i plasmaprøver og er en rask og enkel metode, men har som ulempe at opprensningen av prøven er relativt liten, og gjør at PPT ikke er en selektiv metode. Analytter kan felle ut sammen med proteinene og prøven kan inneholde plasmakomponenter (eksempelvis fosfolipider) som kan gi matrikseffekter i form av ioneundertrykkende effekt [4, 5]. SPE gir rene ekstrakter, men utstyret som brukes er kostbart og forbruket av løsemidler er relativt stort. LLE må ofte gjøres flere ganger for å få høyt utbytte, bruker store mengder organiske løsemidler, er arbeidsintensivt og vanskelig å automatisere. *Supported liquid extraction* (SLE) er en variant av LLE som kan automatiseres, men også dette er en kostbar metode. Mikroversjoner av de tradisjonelle metodene LLE og SPE har blitt utviklet for lettere å kunne automatisere prøveopparbeidelsen, bruke mindre løsemiddel og for å kunne arbeide med små volum biologiske prøver [6]. *Solid-phase microextraction* (SPME) er SPE i mikroversjon og bruker ikke organiske løsemidler, men utstyret er kostbart. *Liquid-phase microextraction* (LPME) og videreutviklingen av LPME;

*hollow fibre-LPME* (HF-LPME) er mikroversjoner av LLE, men er lite brukervennlige og vanskelig å automatisere.

*Parallell artificial liquid membrane extraction* (PALME) er en annen mikroversjon av LLE og en modifisert versjon av HF-LPME som kan gjøre 96 prøveopparbeidelser parallelt, og gir selektiv opprensning av de biologiske prøvene [7-9]. PALME bruker en *supported liquid membrane* (SLM, organisk væskemembran) for å ekstrahere analytter fra en vandig biologisk prøve til en ny vandig mottakerløsning som kan injiseres direkte i LC-MS/MS. Foreløpig er det publisert artikler som viser at PALME er egnet til å ekstrahere sure og basiske legemidler fra plasma [8, 10-12]. Fordelene til PALME sammenlignet med LLE og HF-LPME er at utstyret som brukes er kommersielt tilgjengelig, det kan automatiseres, arbeidsprosedyren er enkel og det brukes små volum av biologiske prøver og organiske løsemidler. Sammenlignet med SPE og SPME er PALME billigere, og bruker mindre organisk løsemiddel enn SPE. Som PALME er i dag, anses det som reelt at konseptet snart kan implementeres i rutinelaboratorier.

PALME er foreløpig lite kjent og må promottes for å bli en rutinemetode. Det er derfor et ønske å utvide applikasjonsområdet til PALME ved å utvikle nye metoder for stoffer som ligger i ytterkanten av hvilke fysikalsk-kjemiske egenskaper det tidligere er blitt arbeidet med. For PALME er dette blant annet stoffer som er svært hydrofile eller svært hydrofobe, som for eksempel vannløselige og fettløselige vitaminer. En litteraturstudie fra 2016 viser at prøveopparbeidelsesmetoder som brukes til ekstraksjon av både vannløselige og fettløselige vitaminer fra plasma, ofte innebærer PPT med etterfølgende LLE eller SPE, eller bare PPT eller LLE [13]. Etersom PALME har mange fordeler over disse metodene, er vannløselige og fettløselige vitaminer potensielle kandidater for ekstraksjon med PALME. I tillegg er det viktig at det utvikles generiske PALME-metoder for å forenkle implementeringen i rutinelaboratorier.

## 1.2 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke nye applikasjonsområder til PALME for å skape mer interesse for konseptet. Det var ønskelig å se om PALME kunne utføres på vannløselige og fettløselige vitaminer som vanligvis ekstraheres med de tradisjonelle metodene PPT, LLE og SPE. Det var også ønskelig å teste en generisk PALME-metode til ekstraksjon av basiske, lipofile legemidler. Oppgaven ble delt i tre deloppgaver:

1. Utvikling av metode for ekstraksjon av de vannløselige vitaminene B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub> og B<sub>12</sub>
2. Utvikling av metode for de fettløselige vitaminene A, D og E
3. Teste og evaluere generisk PALME-metode for monobasiske legemidler med  $\log P > 2$

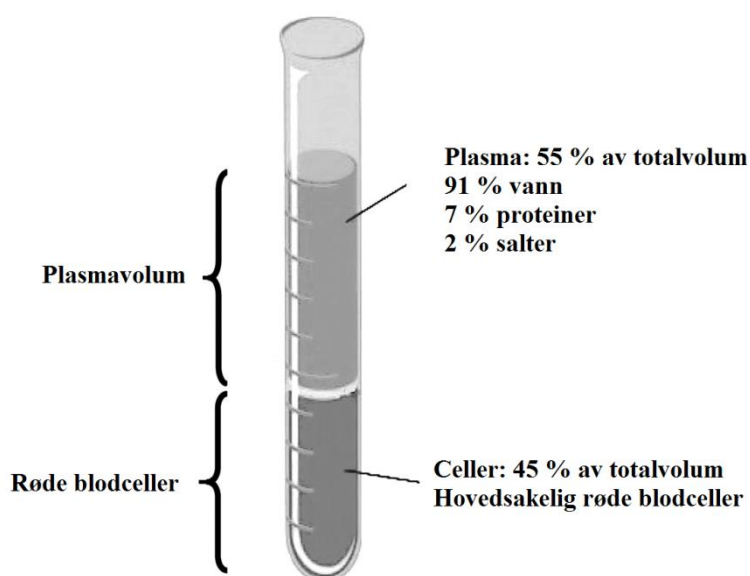
Resultatene under 1. og 2. er oppsummert i henholdsvis Appendiks 4 og Appendiks 5, siden disse delene ikke ble fullført på grunn av lave ekstraksjonsutbytter. Resultatene under 3. er beskrevet videre i hoveddelen av oppgaven. Fokuset er således lagt på generisk metode for monobasiske legemidler.

## 2 Teori

### 2.1 Blod som biologisk matriks

Legemidler har et terapeutisk område hvor blodkonsentrasjonen av legemiddelet bør ligge over en viss grense for å oppnå effekt, men samtidig under en viss grense for å unngå bieffekter eller toksiske effekter. Blodkonsentrasjonen kan variere mellom personer og pasientgrupper på bakgrunn av blant annet ulik legemiddelmetabolisme (CYP-enzymmer), alder og kjønn [14, 15]. Denne variasjonen kan føre til at en standarddose av et legemiddel ikke gir effekt hos noen, mens den hos andre gir bieffekter. Blodkonsentrasjonen av legemiddelet kan derfor kontrollmåles om man mistenker underdosering eller overdosering; såkalt *therapeutic drug monitoring* (TDM, terapikontroll) [14]. TDM kan også brukes som et hjelpemiddel til persontilpasset medisiner, hvor målet blant annet er at pasienter skal få legemiddeldoser som tar høyde for individuelle variasjoner i farmakologisk respons [16]. Blod er en av de mest brukte biologiske matriksene, og er den mest egnede matriksen til bruk i farmakodynamiske analyser fordi blodkonsentrasjonen av et legemiddel gjenspeiler farmakologisk effekt [5, 17].

Blod er en kompleks blanding som grovt kan deles inn i komponentene røde og hvite blodceller, proteiner, salter og fosfolipider [18]. En blodprøve med hovedbestanddelene er vist i Figur 1, hvor plasma er den vandige væsken blodkomponentene er suspendert i. I tillegg til dette, er det per 2018 kartlagt over 20 000 metabolitter i blod [19].



**Figur 1** Bestanddelene i en sentrifugert blodprøve. Figuren er modifisert fra [20]

Proteiner og lipider, blant andre komponenter, i blod har vist seg å kunne ha effekt på signalene analyttene gir under LC-MS/MS-analyse og kalles matrikseffekter [2]. Matrikseffektene kan gi ioneundertrykkende eller ioneforsterkende effekt og betyr at signalene analyttene gir, blir henholdsvis lavere eller høyere enn det de skal være. Ved kvantitative analyser vil matrikseffektene kunne gi ukorrekte resultater, og det er derfor viktig å bearbeide blodprøven før en LC-MS/MS-analyse for å redusere effektene proteiner og lipider kan ha [4, 5].

## 2.2 Prøveopparbeidelse

Hensikten med prøveopparbeidelse er å klargjøre de biologiske prøvene til analyse på et analytisk instrument. Det finnes ulike metoder, men alle har til felles at hensikten er å gjøre prøvene så rene som mulig slik at man sitter igjen med analyttene man vil analysere og minst mulig komponenter som proteiner og lipider. Proteiner kan, i tillegg til å påvirke signalene analyttene gir, tette og skade analysekolonnen som blir brukt [18]. Risikoen for matrikseffekter kan reduseres betydelig med gode prøveopparbeidelsesmetoder som fjerner mange av komponentene fra prøven; prøveopparbeidelsen er av den grunn en essensiell del av hele LC-MS/MS-analysen.

Av prøveopparbeidelsesmetoder innen bioanalyse er LLE, SPE og PPT de mest brukte [4]. Med de to førstnevnte metodene kan analyttene til en viss grad spesifikt isoleres fra prøvemedium, og man sitter igjen med en renere løsning. Ved bruk av PPT felles proteinene i blodprøven ut med fellingsreagens (typisk acetonitril) og man sitter igjen med en blodprøve uten proteiner. Som prøveopparbeidelsesmetode ble det i denne oppgaven brukt en variant av LLE, slik at SPE og PPT ikke kommenteres nærmere.

### 2.2.1 Væske-væske-ekstraksjon

Væske-væske-ekstraksjon (LLE) er overføring av analytter fra en væskefase til en annen. Systemet består av en vandig fase og en organisk fase som ikke er blandbare med hverandre. I bioanalyse overføres analytter fra den vandige til den organiske fasen, siden biologiske væsker er vandige.

Fordelingsforholdet  $D$  til en analytt mellom væskefasene styres av polariteten til analytten og beskrives for en nøytral analytt med fordelingskoeffisienten  $K_d$ , vist i Formel 1 hvor  $[A]_{org}$  og

$[A]_{aq}$  representerer konsentrasjonen av analytten i henholdsvis organisk og vandig fase. En analytt med høy  $K_d$  fordeler seg i stor grad inn i den organiske fasen.

**Formel 1 [21]** 
$$D = K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

Fordelingsforholdet  $D$  til basiske analytter avhenger av fordelingskoeffisienten  $K_d$ ,  $pK_a$  til analytten og  $pH$  i den vandige fasen. Det er den uladde formen som fordeler seg inn i den organiske fasen, og siden basiske analytter dissosierer i den vandige fasen, kan fordelingsforholdet økes ved å justere  $pH$ . Ved å justere  $pH$  i den vandige fasen til to  $pH$ -enheter over  $pK_a$ -verdien til analytten, kan man oppnå et høyt fordelingsforhold siden omtrent 99 % av analytten er på uladet form [22].

LLE kan utføres med to eller tre faser. Et tre-fase-system består av en vandig prøveløsning, en organisk fase og en ny vandig mottakerløsning. I tre-fase-systemet ekstraheres analyttene fra den vandige prøveløsningen inn i den organiske fasen, for deretter å bli ekstrahert til en ny, vandig mottakerløsning. Dette kalles tilbakeekstraksjon og er en meget selektiv metode som fjerner mange matrikskomponenter i prøven. Tre-fase-LLE kan gi mottakerløsninger som kan injiseres direkte i LC-MS/MS, og hvis mottakerløsningen i tillegg har et mindre volum enn den opprinnelige prøveløsningen, blir analyttene oppkonsentrert.

Tre-fase-LLE gir rene prøver, men krever store mengder organisk løsemiddel, er arbeidsintensivt og ikke egnet for automatisering [23].

### 2.2.2 Væskefase-mikroekstraksjon

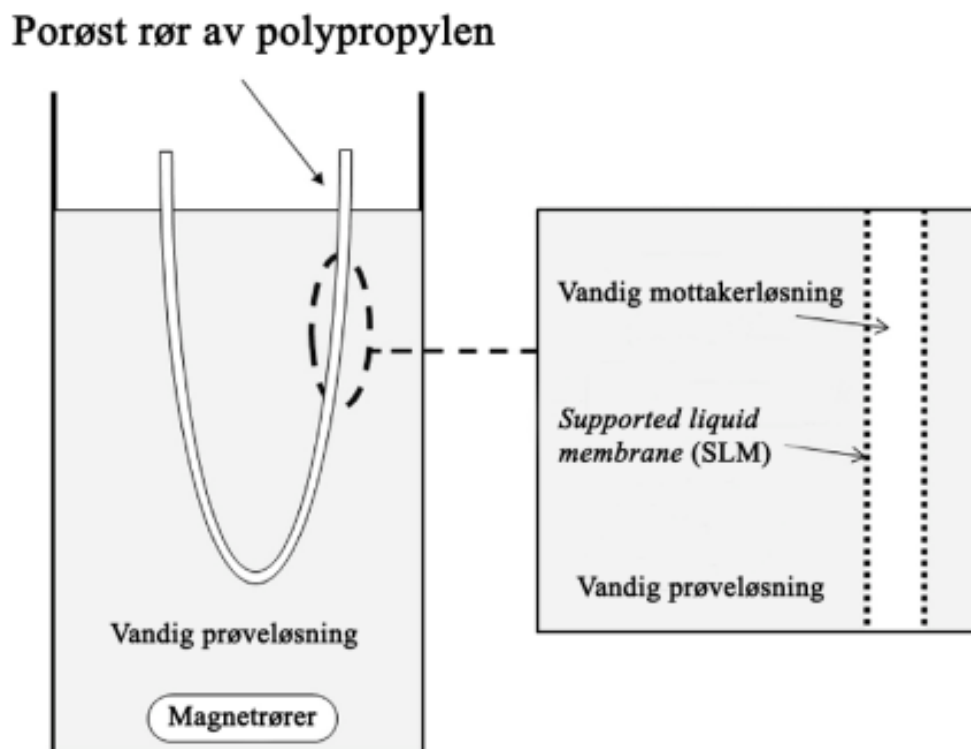
Videreutvikling av LLE på slutten av 90-tallet førte til en miniatyrisering av ekstraksjonsmetoden i både to- [24] og tre-fase-systemer [23]; kalt *liquid-phase microextraction* (LPME). Tre-fase-LPME ble i 1999 videre modifisert til tre-fase-LPME i et hulfiberformat [25]; kalt *hollow fiber-LPME* (HF-LPME). I tre-fase-HF-LPME benytter man et porøst rør av polypropylen med organisk væske immobilisert i hulfibrene (Figur 2). Den organiske væsken refereres da som *supported liquid membrane* (SLM). Røret med SLM settes i ekstraksjonssystemet med den vandige prøveløsningen, og hulrommet i røret fylles med en vandig mottakerløsning. Analyttene ekstraheres fra den vandige prøveløsningen og inn i SLM i hulfibrene, for deretter å bli videre ekstrahert til den vandige mottakerløsningen i rørets hulrom.

Det etableres en likevekt mellom prøveløsningen og SLM og mellom mottakerløsningen og SLM som vist i Formel 2, hvor hvert ledd representerer konsentrasjonen av analytt i de forskjellige fasene.

$$\text{Formel 2} \quad A_{\text{prøveløsning}} \rightleftharpoons A_{\text{SLM}} \rightleftharpoons A_{\text{mottakerløsning}}$$

For å drive ekstraksjonen kan pH i både prøveløsningen og mottakerløsningen reguleres slik at analyttene er uionisert i prøveløsningen og ionisert i mottakerløsningen. Denne pH-gradienten forskyver likevekten mellom prøveløsningen og SLM mot SLM, og likevekten mellom SLM og mottakerløsningen mot mottakerløsningen.

Oppsettet til tre-fase-HF-LPME er vist i Figur 2.



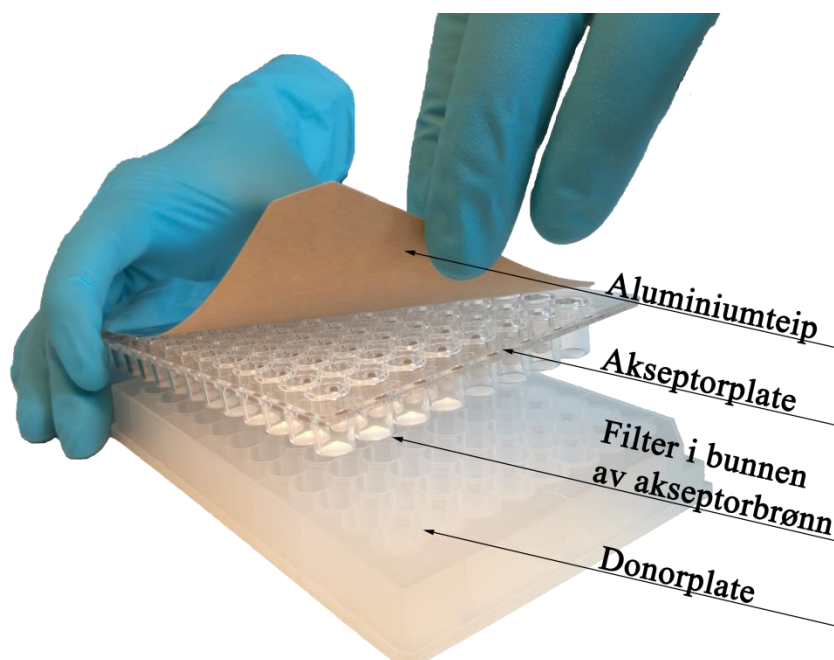
**Figur 2** Oppsettet til tre-fase-HF-LPME med et porøst rør med SLM dyppet i en vial med vandig prøveløsning. Prøveløsningen og mottakerløsningen danner de to vandige fasene. Figuren er modifisert fra [6]

Fordelene knyttet til tre-fase-HF-LPME er at mottakerløsningen er vandig og kan injiseres direkte på væskekromatografen, systemet bruker lite organisk løsemiddel, gir tilsvarende prøveopprensing som LLE og høy oppkonsentrering [26, 27]. Noen ulemper med HF-LPME er at hvert system som brukes til ekstraksjon må settes sammen manuelt og er vanskelig å automatisere [26, 28].



### 2.2.3 Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)

*Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) ble introdusert i 2013 som en videreutvikling av HF-LPME og gjøres i kommersielt tilgjengelig utstyr som lett kan automatiseres [28]. PALME baserer seg på de samme grunnleggende prinsippene for tre-fase-ekstraksjon, men er utformet i et 96-brønnsformat som skiller seg fra HF-LPME i den geometriske strukturen og antall ekstraksjoner som kan gjøres parallelt. Oppsettet består av en 96-brønns donorplate, en 96-brønns akseptorplate med et filter i bunnen av hver brønn og aluminiumteip som beskyttelsesdeksel; vist i Figur 3. Akseptorplaten markedsføres for filtrering, men kan også brukes i PALME. Prosedyren for PALME er: i) brønnene i donorplaten blir tilsatt vandig prøveløsning; heretter kalt donorløsning; ii) filteret blir tilsatt en organisk væske som danner SLM; iii) brønnene i akseptorplaten blir tilsatt en vandig mottakerløsning, heretter kalt akseptorløsning; iv) aluminiumteip plasseres over brønnene på akseptorplaten for å hindre søl og fordampning av akseptorløsningene; v) akseptorplaten og donorplaten klemmes sammen og ristes på en ristemaskin ved 900 rpm. Ristingen foregår i typisk 45 minutter for å få effektive ekstraksjoner. Ekstraksjonen drives av en pH-gradient og analyttene ekstraheres fra donorløsningen og inn i SLM, for deretter å bli ekstrahert fra SLM og inn i akseptorløsningen.



**Figur 3** PALME-oppsettet består av en donorplate, akseptorplate med et filter til SLM i akseptorbrønnene og aluminiumteip som legges over akseptorplaten

Donorplaten som benyttes i PALME er av polypropylen (PP) og hver brønn rommer 500 µl. Det totale volumet til donorløsningen i hver brønn er optimalt 200–250 µl og typisk volum er 250 µl [29]. En basisk eller sur buffer bør tilsettes brønnene ved ekstraksjon av henholdsvis basiske [11, 12] og sure [10] analytter for å undertrykke ioniseringen av analyttene og øke fordelingen inn i SLM [29]. En organisk væske som metanol kan i tillegg tilsettes donorløsningen for å eliminere eventuelle adsorpsjonseffekter til donorplaten.

Filteret i bunnen av hver brønn i akseptorplaten er en porøs polyvinylidenfluorid (PVDF)-membran. SLM skiller donorløsningen og akseptorløsningen fra hverandre når platene klemmes sammen. Mengden organisk væske som brukes til å lage SLM er typisk 3–5 µl og må være uløselig i vann for ikke å blande seg med donor- og akseptorløsningene som hovedsakelig er vandige løsninger [29]. Andre egenskaper SLM bør ha er høyt kokepunkt for ikke å fordampe og lav viskositet for å øke diffusjonen gjennom membranen. Den bør også være lipofil, men samtidig ha polare egenskaper for effektivt å transportere analyttene gjennom SLM ved å ha balanse mellom polare og upolare molekylære interaksjoner mellom SLM og analyttene. Membranmaterialet PVDF kan gi uspesifikke bindinger av analyttene og redusere ekstraksjonsutbyttet, men kan omgås ved å bytte ut materialet med PP [28]. Akseptorplater med PP-membran er ikke kommersielt tilgjengelig, men tilsetning av en ionisk bærer i SLM har for basiske analytter vist å motvirke de uspesifikke bindingene i PVDF-materialet [11, 12].

Brønnene i akseptorplaten tilsettes typisk 50 µl sur eller basisk buffer for henholdsvis basiske og sure analytter. Hvis akseptorløsningen er kompatibel med LC-MS/MS, kan den injiseres direkte i analyseinstrumentet. Ved å ha motsatt pH i donor- og akseptorløsningene, vil analyttene være uionisert i donorløsningen og ionisert i akseptorløsningen. Forskjellen danner en pH-gradient som driver ekstraksjonen og i tillegg hindrer tilbakeekstraksjon fra akseptorløsningen til donorløsningen [28].

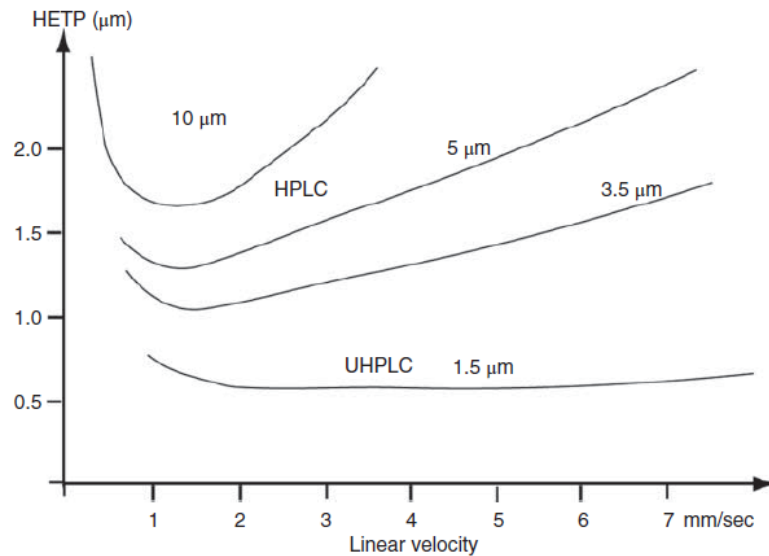
Den store fordelen knyttet til PALME er oppsettet som muliggjør automatisering av ekstraksjonene. Dette er nylig vist i en artikkel hvor valideringsforsøk ble delvis automatisert [12]. Det er også vist at PALME effektivt fjerner fosfolipider som kan bidra til matrikseffekter [8, 9]. I motsetning til LLE og SPE, har PALME et lavt forbruk av organisk løsemiddel og er en miljøvennlig prøveopparbeidelsesmetode. God prøveopprensing og muligheten til å gjøre 96 ekstraksjoner parallelt er andre fordeler.

## 2.3 Væskekromatografi

Væskekromatografi brukes til separasjon av analyttene. Dette gjøres med instrumenter kalt *high-pressure liquid chromatography* (HPLC) og *ultrahigh-pressure liquid chromatography* (UHPLC); en videreutvikling av HPLC. Et instrument består av pumper, en injektor, kolonne og en detektor [22]. Pumpene pumper mobilfase gjennom systemet, og ved kolonneinngangen injiserer injektoren analyttene som så blander seg med mobilfasen og presses med høyt trykk gjennom kolonnen.

Kolonnens pakkemateriale og mobilfasesammensetningen bestemmer hva slags type væskekromatografi man gjør. Den mest anvendte typen er omvendt-fase-kromatografi hvor pakkematerialet er sfæriske partikler med et hydrofobt silika-materiale med lange karbonkjeder bundet til seg; mest brukt er C18-kjeder [18, 30]. De svært hydrofobe partiklene er stasjonærfasen i kolonnen hvor analyttene i mobilfasen retarderes. Mobilfasen eluerer analyttene gjennom kolonnen, som i omvendt-fase-kromatografi består av en vandig væske med et blandbart organisk løsemiddel. Siden stasjonærfasen er statisk for en valgt kolonne, justeres analyttenes retensjon på kolonnen av mobilfase-sammensetningen under analysen. Mobilfasen kan inneholde sure eller basiske buffere og varierende grad av organisk løsemiddel, alt etter analyttenes fysikalsk-kjemiske egenskaper. For hydrofobe, basiske analytter med sterke interaksjoner med stasjonærfasen, kan det være aktuelt med en mobilfase med lav pH og relativt høy prosentandel organisk løsemiddel. Mengden organisk løsemiddel kan forandres gjennom analysen med gradienteluering [21].

Fordelen med UHPLC over HPLC er at UHPLC kan gi mer effektive analyser på kortere tid. Dette henger sammen med at UHPLC kan utnytte korte kolonner med liten partikkelstørrelse. Effektiviteten til en kolonne måles i høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H) og er et mål på båndspredningen i kolonnen. Lavere H betyr høyere effektivitet. I van Deemters plot er H plottet mot mobilfasehastigheten for partikler med ulik partikkelstørrelse og viser at små partikler har høy effektivitet selv ved høy mobilfasehastighet; vist i Figur 4.



**Figur 4** Endring i HEPT ( $H$ ) som funksjon av mobilfasehastighet. Mindre partikler er mer effektive enn større partikler, men krever UHPLC-instrument. Figuren er hentet fra [18]

$H$  er gitt i van Deemters ligning i Formel 3

**Formel 3** 
$$H = A + \left(\frac{B}{u}\right) + Cu$$

$A$  = Diffusjon i mobilfase

$B$  = Eddydiffusjon

$C$  = Massetransport mellom stasjonær- og mobilfase

$U$  = Mobilfasehastighet

$A$ ,  $B$  og  $C$  er parameterne som i tillegg til mobilfasehastigheten påvirker høydeekvivalenten.

Effektiviteten er proporsjonal med kolonn lengden og invers proporsjonal med partikkelstørrelsen, så ved å redusere kolonn lengden med samme faktor som partikkelstørrelsen, taper man ikke effektivitet. I tillegg kan UHPLC utnytte kolonner med liten indre diameter som gir mer konsentrerte analytter og lavere deteksjonsgrense på konsentrasjonsavhengige detektorer [22]. Totalt genererer korte kolonner med liten indre diameter og små partikler et veldig høyt trykk, slik at kun UHPLC-instrumenter er i stand til å utnytte deres fulle potensiale. Fordelen er at man kan analysere små volum, bruke mindre mobilfase og få kortere analysetid uten at effektiviteten går ned.

## 2.4 Massespektrometri

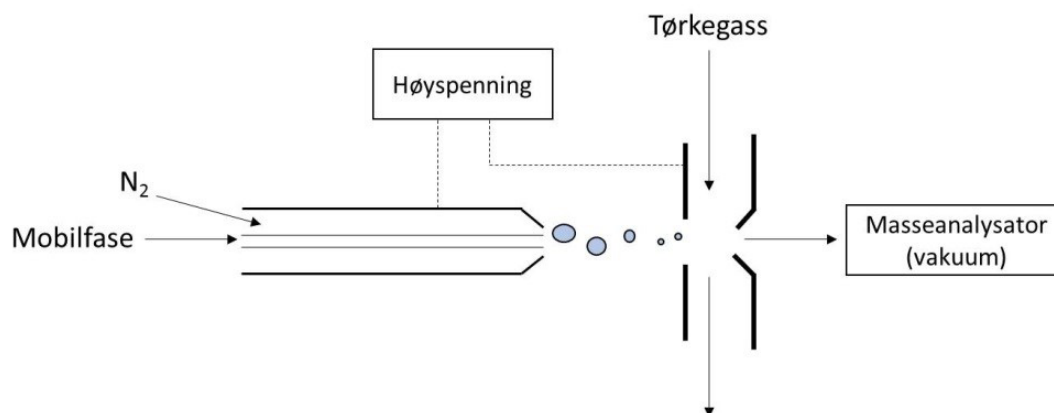
Et massespektrometer (MS) er én av mange detektorer som kan kobles til en HPLC/UHPLC for å detektere analyttene som eluerer ut av kolonnen. Kombinasjonen kalles kort LC-MS/UHPLC-MS og er i dag standardinstrumenter for kvantitativ bioanalyse fordi de kan detektere analytter i lave konsentrasjoner, gir korte analysetider og høy selektivitet [1].

Et massespektrometer består av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Analyttene blir separert og detektert basert på deres masse-til-ladning-forhold ( $m/z$ ), og må derfor være ionisert før de entrer analysatoren. For analytter med ioniserbare grupper kan ioniseringen skje ved å styre pH i mobilfasen i væskekromatografen, eller ved hjelp av ionekilden som er den første komponenten analyttene treffer på etter kromatografisk separasjon. For analytter som ikke ioniseres i mobilfasen, må ioniseringen skje ved hjelp av ionekilden. Utgangen av kolonnen i LC er direkte koblet til *interface* i MS som er overgangen mellom LC og MS. Ionekilden kan enten sitte i overgangen og ionisere analyttene under atmosfærisk trykk, eller inne i MS og ionisere under vakuum [22]. Massespektrometeret opererer under vakuum for at de ladde analyttene ikke skal kollideres med gasmolekyler fra luften og for å kunne transporteres til analysatoren. Analyttene må således, i tillegg til å bli ionisert, overføres til gassfase [21].

### 2.4.1 Elektrosprayionisering

Det finnes ulike ioniseringskilder til ulike formål. Elektrosprayionisering (ESI); vist i Figur 5, er brukt i denne oppgaven og passer godt for analytter med polare grupper. I overgangen mellom LC og MS presses mobilfasen med analyttene inn i et lite kapillær som er koblet til en elektrode plassert etter kapillæret [18]. Ved utgangen av kapillæret sprayer mobilfasen med en forstøvergass for å danne en aerosol. Mellom kapillæret og elektroden er det pålagt en spenning på typisk +/- 3–5 kV som gir aerosol-dråpene ladning når de forlater kapillæret. I motsatt retning av aerosolen sprayer det en tørkegass for å fordampe aerosol-dråpene. Etter hvert som en aerosol-dråpe fordampes og blir mindre, blir den frastøtende elektrostatiske kraften mellom ionene av samme ladning inne i dråpen større. Når den frastøtende kraften overstiger overflatespenningen, sprekker dråpen og lager nye, mindre dråper. Denne prosessen gjentar seg for de nye dråpene og skjer for alle aerosol-dråpene. Ionene vil til slutt skilles fra dråpene gjennom fordampning av enten ionene eller dråpene, slik at resultatet er

ioner i gassfase. Spenningen på kapillæret er enten positivt eller negativt avhengig av analyttenes ladning.

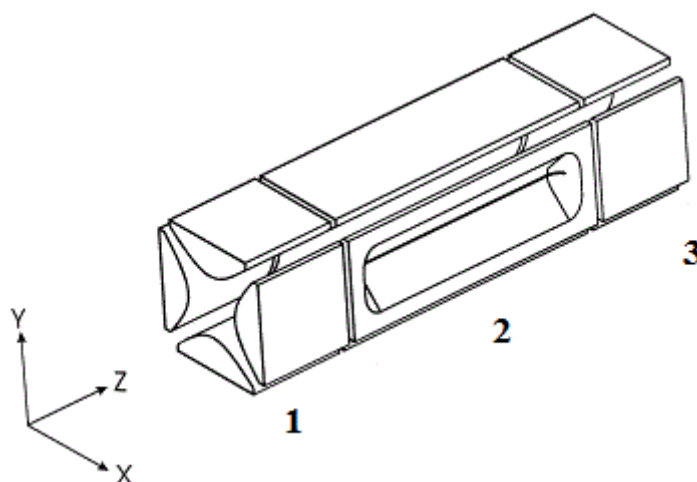


**Figur 5** Skjematisk fremstilling av ESI. Figuren er modifisert fra [21]

Etter ioniseringen og overføringen til gassfasen, fraktes ionene i vakuum frem til masseanalysatoren. Masseanalysatorene som ble brukt i denne oppgaven var en to-dimensjonal ionefelle (lineær ionefelle) og en trippel kvadrupol

### 2.4.2 Lineær ionefelle

I en MS med lineær ionefelle fraktes de ioniserte analyttene videre fra ionekilden til ionefellen som består av 3 deler plassert i rekkefølge, hvor hver del består av fire hyperbolske eller sylindriske staver; vist i Figur 6.



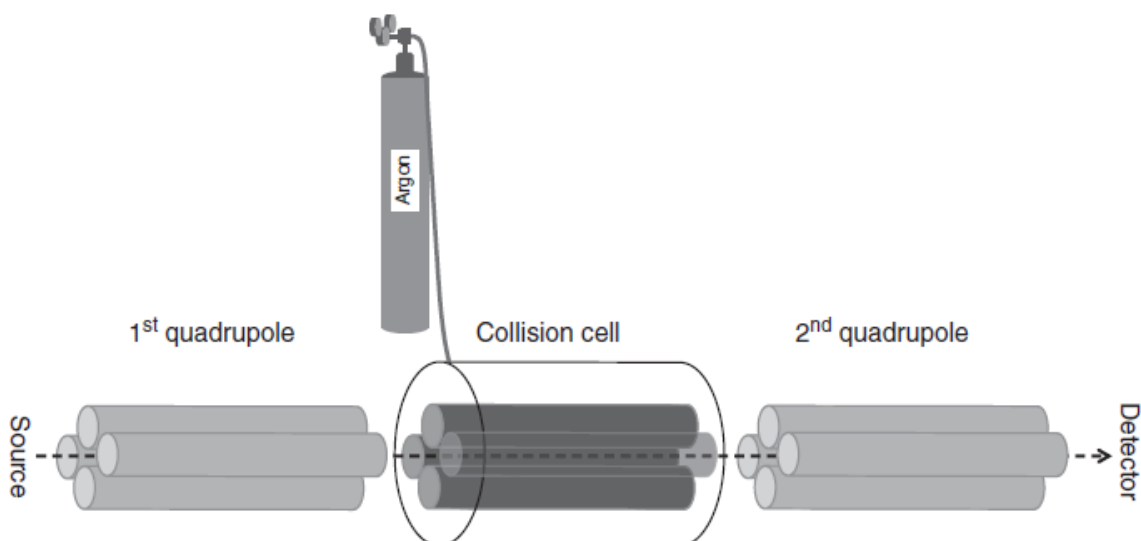
**Figur 6** Skisse av en lineær ionefelle med tre deler. Figuren er modifisert fra [31]

Ionene fraktes inn i ionefellen og fanges i den midterste delen ved at delene ytterst på ionefellen har spenning av lik polaritet. Ionene holdes på plass aksialt ved hjelp av likestrøm

og radiaalt ved hjelp ved radiofrekvent spenning (RF) [31]. Etter å ha blitt fanget i den midterste delen, destabiliseres ionene man ikke er interessert i slik at bare ionet med  $m/z$ -verdien man ønsker å analysere er igjen [18]. Hvis ionefellen i tillegg også fragmenterer ionene, kalles det MS/MS (tandem massespektrometri). I MS/MS akselereres ionet som er fanget til det får høy nok energi til å fragmentere når det kolliderer med heliumatomene som er tilstede i analysatoren. Fragmentene samles i den midterste delen igjen og analyseres.

### 2.4.3 Trippel kvadrupol

En trippel kvadrupol består av tre kvadrupoler, hvor den midterste er en kollisjonscelle. Hver kvadrupol består av fire sylindriske staver, vist i Figur 7.



**Figur 7** Skisse av en trippel kvadrupol. Figuren er hentet fra [18]

I hver kvadrupol har det ene paret av sylindriske staver som står motsatt av hverandre, lik likestrøm og RF [18]. De to andre stavene har motsatt likestrøm og RF. Dette danner et oscillerende elektrisk felt. Ionene som kommer fra ioniseringskilden fraktes inn i den første kvadrupolen og begynner å oscillere i en stabil eller ustabil bane. Ionene med ustabil bane vil kollidere med stavene i den første kvadrupolen, slik at kun ionet med den rette  $m/z$ -verdien når kollisjonscellen. I kollisjonscellen akselereres ionet som så kolliderer med gassmolekyler i kollisjonscellen og fragmenterer (MS/MS). Dette kalles *collision-induced dissociation* (CID). Etter CID fraktes fragmentene til den siste kvadrupolen og detekteres.

## 3 Eksperimentelt

### 3.1 Analytter – fysikalsk-kjemiske egenskaper

Analyttene som ble brukt i denne oppgaven er sammenfattet i Tabell 1.

**Tabell 1** Analytten og deres log P, pKa og molekylvekt

Komponent	log P	pKa	Molekylvekt (g/mol)
2C-E	2,03	9,71	209,29
3-fluorfenmetrazin	1,93	8,12	195,23
6-APB	1,96	9,97	175,23
9-OH-risperidon	1,76	8,67	426,49
AH-7921	4,00	9,48	329,27
Alfa-pyrrolidinopentiofenon (Alfa-PVP)	3,36	7,86	231,33
Alimemazin	4,41	9,42	298,45
Amiodaron	7,64	8,47	645,02
Amitriptylin	4,81	9,76	277,40
Amitriptylin	4,81	9,76	277,40
Baklofen	-0,78	9,79 (base); 3,89 (syre)	213,66
Carfentanyl	3,67	8,05	394,51
Citalopram	3,76	9,78	324,39
Doksepin	3,84	9,76	279,38
Duloksetin	4,20	9,70	297,40
Etylfenidat	2,61	9,09	247,33
Fentanyl	3,82	8,77	336,47
Fluoksetin	4,17	9,80	309,33
Haloperidol	3,66	8,05	375,87
Hydroksybupropion	2,22	7,65	255,74
Hydroksyzin	3,41	7,82	374,91
Ketobemidon	2,49	8,09 (base); 9,44 (syre)	247,33
Klometiazol	1,77	3,18	161,65
Klomipramin	4,88	9,20	314,85
Klorprotiksen	5,07	9,76	315,86
Klozapin	3,40	7,35	326,82
Kvetiapin	2,81	7,06	383,51
Levomepromazin	4,25	9,42	328,47
Lidokain	2,84	7,75	234,33
Metoprolol	1,76	9,67	267,36
Metylendioksyprovaleron (MDPV)	2,99	7,31	275,34
Mianserin	3,83	6,92	264,37
Nortriptylin	4,43	10,47	263,37
Nortriptylin	4,43	10,47	263,37
Noskapin	2,58	7,14	413,42



O-desmetyltramadol	1,72	8,97 (base); 9,62 (syre)	249,35
Oksprenolol	2,17	9,67	265,35
Olanzapin	3,39	7,24	312,43
Paroksetin	3,15	9,77	329,37
Pentedron	2,58	8,20	191,27
Petidin	2,46	8,16	247,34
Promazin	3,93	9,20	284,42
Prometazin	4,92	9,05	284,42
Propranolol	2,58	9,67	259,34
Sertralin	5,15	9,85	306,23
Trimipramin	4,76	9,42	294,44
Trimipramin maleate salt	4,76	9,42	294,44
Vareniklin	1,01	9,73	211,26
Venlafaksin	2,74	8,91	277,40

*Informasjon er hentet fra [32] og en produktoversikt tilgjengelig fra Oslo Universitetssykehus (OUS)*

## 3.2 Kjemikalier

Analyttene som ble benyttet i denne oppgaven er sammenfattet i Tabell 2, mens øvrige kjemikalier er sammenfattet i Tabell 3.

**Tabell 2** *Analyttenes renhets- og produksjonsdata*

Komponent	Renhet	Produsent	By/land
2C-E	99,6 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
3-fluorfenmetrazin	99 %	Chiron	Trondheim, Norge
6-APB	97 %	Chiron AS	Trondheim, Norge
9-OH-risperidon	99,3 %	Chiron	Trondheim, Norge
AH-7921	~100 %	Cayman Chemical Company	Ann Arbor, MI, USA
Alimemazin	~100 %	USP	Rockville, Maryland, USA
Alfa- pyrrolidinopentiofenon (Alfa-PVP)	99,5 %	Chiron	Trondheim, Norge
Amiodaron HCl	≥ 98 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Amitriptylin HCl	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Amitripylin	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Baklofen	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Carfentanyl	98 %	Toronto Research Chemicals Inc	Toronto, Canada
Citalopram	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO,

## Ekspérimentelt

			USA
Doksepin	~100 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Duloksetin	~100 %	Cerilliant	Round Rock, TX, USA
Etylfenidat	~100 %	Cerilliant	Round Rock, TX, USA
Fentanyl	97,8 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Fluoksetin	94 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Haloperidol	~100 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Hydroksybupropion	~100 %	GlaxoSmithKline	Brentford, London, England
Hydroksyzin	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Ketobemidon	~100 %	Toronto Research Chemicals Inc	Toronto, Canada
Klometiazol	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Klomipramin	~100 %	Sigma	Steinheim, Tyskland
Klorprotiksen	98 %	Toronto Research Chemicals Inc	Toronto, Canada
Klozapin	~100 %	Chiron	Trondheim, Norge
Kvetiapin	100 %	Cerilliant	Round Rock, TX, USA
Levomepromazin	98,9 %	Chiron	Trondheim, Norge
Lidokain HCl	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metoprolol	99,3 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metylendioksyprovaleron (MDPV)	~100 %	Cerilliant	Round Rock, TX, USA
Mianserin	98 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Nortriptylin HCL	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Nortriptylin	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Noskapin	97 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
O-desmetyltramadol	~100 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Oksprenolol HCl	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Olanzapin	~100 %	Eli Lilly	Indianapolis, IN, USA
Paroksetin	97,2 %	USP	Rockville, MD,

Pentedron	99,8 %	Lipomed	USA Arlesheim, Nederland
Petidin	~100 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Promazin HCl	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Prometazin	99,8 %	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Propranolol	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Sertralin	~100 %	Pfizer AS	New York City, NY, USA
Trimipramin	~100 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trimipramin maleate salt	–	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA
Vareniklin	90 %	Pfizer AS	New York City, NY, USA
Venlafaksin	99 %	Sigma–Aldrich	St. Louis, MO, USA

**Tabell 3** Diverse kjemikalier

Komponent	Renhet	Produsent	By/land
Acetonitril	Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Dimetylsulfoksid	≥ 99,5 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Dodecylacetat	97 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Maurisyre	98 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Natriumbikarbonat	≥ 99,5 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Natriumkarbonat	≥ 99,9 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Renset vann	MilliQ;Ultrapure type 1	Millipore	Molsheim, Frankrike
Trioktylamin	–	Cognis Corporation	Cincinnati, OH, USA

### 3.3 Utstyr

Pipetteutstyr som ble benyttet er sammenfattet i Tabell 4 og analyseinstrumentet er sammenfattet i Tabell 5 og Tabell 6. Utstyret brukt til PALME er vist i Tabell 7. Øvrig utstyr og forbruksmateriell er gjengitt i Tabell 8 og Tabell 9.

**Tabell 4** Pipetter og pipettespisser

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
BIOHIT pipetter	M20, 200, 1000	Sartorius	Göttingen, Tyskland
BIOHIT pipettespiss	5 ml		
Combitips advanced	0,1 ml, 2,5 ml, 5 ml	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Multipipette	Multipipette® Plus	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Sartorius pipetter	mLINE 20, 100, 300, 5000	Sartorius	Göttingen, Tyskland
Sartorius pipettespisser	Optifit refill tips 200, 350, 1000 µl	Sartorius	Göttingen, Tyskland

**Tabell 5** Analyseinstrument brukt til analyse på ionefelle

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
Dataprogram	Xcalibur 2.2 SPI.48	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
Kolonne	HSS T3 1,8 µm 2,1x100 mm	Waters	Milford, MA, USA
MS/MS	LTQ XL lineær ionefelle	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
UHPLC	Dionex UltiMate 3000 RS	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA

**Tabell 6** Analyseinstrument bruk til analyse på trippel kvadrupol

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
Dataprogram	MassLynx 4.1	Waters	Milford, MA, USA
Kolonne	HSS T3 1,8 µm 2,1x100 mm	Waters	Milford, MA, USA
MS/MS	Xevo trippel kvadrupol	Waters	Milford, MA, USA
UHPLC	Aquity™ Ultra Performance LC	Waters	Milford, MA, USA

**Tabell 7** Utstyr brukt til PALME

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
Akseptorplate med lokk	MultiScreen®-IP 96-brønnsfilterplate MAIPN4550, klar styren, ikke steril, med Immobilon®-P PVDF membran, porestørrelse 0,45 µm	Millipore	Darmstadt, Tyskland
Aluminiumfolie	Thermowell™ Sealing Tape For 96 Well Plates. Aluminium Certified RNase / DNase Free	Corning Incorporated	Corning, NY, USA
Donorplate	96-brønnsplate. 0,5 ml brønner av polypropylen	Agilent	Santa Clara, CA, USA

**Tabell 8** *Diverse utstyr*

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
Analysevekt	New Classic MF: MS105DU	Mettler Toledo	Greifensee, Sveits
Analysevekt pH-meter	Mettler AE200 744 pH meter	Mettler Toledo Metrohm	Greifensee, Sveits Herisau, Sveits
Ristemaskin	Heidolph Vibramax 100	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Tyskland
Vortexmikser	IKA <sup>®</sup> MS 3 digital	IKA <sup>®</sup> -Werke GmbH & Co. KG	Straufen, Tyskland

**Tabell 9** *Forbruksmateriell*

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By/land
Aluminiumfolie	0,015 mm	–	–
Dramsglass	Diverse størrelser	–	–
Dramsglass2	15 ml clear vials, screw top	Supelco	Bellefonte, PA, USA
Glassvialer til autosamler	Clean pack vial 32 x 11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Glassvial	Clear 2 ml Screw Top vial 13 x 32	Supelco	Bellefonte, PA, USA
Innsats til vialer	Mikroinnsats, 0,1 ml, 31 x 6 mm, clear 15 mm top	VWR International	Radnor, PA, USA
Kork til dramsglass2	18 mm solid cap with aluminum liner for 15 ml vial	Supelco	Bellefonte, PA, USA
Kork til glassvialer	9 mm Combination Seal: PP Short Thread Cap, transparent, centre hole; PTFE virginal, 53 ° Shore D, 0,2 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Plastbeholder og kork til rensset vann	Bottle wide neck + cap. Round LDPE, 100 ml, 250 ml	VWR International	Radnor, PA, USA
Plastsylinder til organiske faser	Micro tube 2 ml with cap Polypropylene	Sarstedt	Nümbrecht, Tyskland
Plastvialer og kork til autosampler	plastic. Snap-top vial, 300 µl with cap and bonded, PTFE/silicone septa	Waters	Milford, MA, USA
Reagensreservoar	Reagent Reservoir, 25 ml, PS, non- sterile	VWR International	Radnor, PA, USA

## 3.4 Løsninger

### 3.4.1 Buffere

0,1 M karbonatbuffer pH 10,4 ble laget etter oppskriften:  $\text{NaHCO}_3:\text{Na}_2\text{CO}_3$  20:80 (v/v) [33]. 100 ml 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$  ble blandet med 400 ml 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  for å lage 500 ml 0,1 M karbonatbuffer.

### 3.4.2 Diverse løsninger

#### Organisk væskemembran

- Dodecylacetat med 1 % (w/w) trioktylamin (TOA).

#### 20 mM maursyre pH 2,5

- 20 mM maursyre ble laget i MilliQ-vann og pH ble målt med pH-meter. 20 mM maursyre pH 2,5 er heretter kalt *maursyre*.

#### Metanol

- Det ble brukt LC-MS grade metanol.

#### Dimetylsulfoksid i maursyre

- 10 % (v/v) dimetylsulfoksid (DMSO) i maursyre ble laget ved å tilsette 100  $\mu\text{l}$  DMSO til 900  $\mu\text{l}$  maursyre.
- 25 % (v/v) DMSO i maursyre ble laget ved å tilsette 250  $\mu\text{l}$  DMSO til 750  $\mu\text{l}$  maursyre.
- 50 % (v/v) DMSO i maursyre ble laget ved å tilsette 500  $\mu\text{l}$  DMSO til 500  $\mu\text{l}$  maursyre.

### 3.4.3 Mobilfaser

Det ble brukt tre sett med mobilfaser. To av settene ble tillaget ved Farmasøytisk institutt. Det tredje settet var tilgjengelig fra OUS.

**Mobilfase A**

1. Maursyre:metanol 95:5 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml metanol til 950 ml maursyre.
2. Maursyre:acetonitril 95:5 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml acetonitril til 950 ml maursyre.
3. 10 mM ammoniumformat pH 3,1, heretter kalt *ammoniumformat* (OUS)

**Mobilfase B**

1. Maursyre:metanol 5:95 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml maursyre til 950 ml metanol.
2. Maursyre:acetonitril 5:95 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml maursyre til 950 ml acetonitril.
3. LC-MS grade metanol (OUS).

**3.4.4 Stammløsninger**

Stammløsningene ble inndelt og arbeidet med i fire grupper: Gruppe I, Gruppe II, Gruppe III og Gruppe IV.

Alle stammløsningene ble laget i metanol og oppbevart i glassbeholdere i kjøleskap ved 2–8 °C.

**Gruppe I, Gruppe II og Gruppe IV**

- Stammløsningene ble laget hver for seg fra tørrstoff i konsentrasjon 1 mg/ml; vist i Tabell 10.

**Gruppe III**

- Stammløsningene var ferdiglaget fra OUS og inneholdt 41 analytter fordelt på 7 beholdere.

## Ekperimentelt

- De 7 stamløsningene ble blandet og fortynnet med metanol i én beholder til en tiendedel av original konsentrasjon. Et utvalg av analyttene med konsentrasjonene er vist i Tabell 10. Fullstendig oversikt ligger i Appendiks 1.

**Tabell 10** *Stamløsningene med analyttenes respektive konsentrasjoner*

	Komponent	Konsentrasjon		Komponent	Konsentrasjon
Gruppe I	Lidokain	4,3 µmol/ml	Gruppe II	Promazin	3,5 µmol/ml
	Oksprenolol	3,8 µmol/ml		Noskapiin	2,4 µmol/ml
				Amiodaron	1,6 µmol/ml
Gruppe III	Olanzapin	10,0 µM	Gruppe IV	Trimipramin	3,4 µmol/ml
	Petidin	40,0 µM		Nortriptylin	3,8 µmol/ml
	Haloperidol	2,0 µM		Promazin	3,5 µmol/ml
	Citalopram	10,0 µM		Amitriptylin	3,6 µmol/ml

### 3.4.5 Prøveløsninger

Alle prøveløsningene ble laget i 0,1 M karbonatbuffer pH 10,4.

#### Gruppe I

- Prøveløsningene ble laget ved å blande stamløsningene i en målekolbe og lage en fortynningsrekke med åtte konsentrasjonsnivåer fra 1000 ng/ml til 10 ng/ml; 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ng/ml.

#### Gruppe II

- Prøveløsningene ble laget ved å blande alle stamløsningene i en målekolbe og lage en fortynningsrekke med åtte konsentrasjonsnivåer fra 1000 ng/ml til 10 ng/ml; 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25, 10 ng/ml.

#### Gruppe III

- Prøveløsningene ble laget fra stamløsningen i en fortynningsrekke på 9 konsentrasjonsnivåer fra en tiendedel til en sekshundrededel av opprinnelig konsentrasjon. Konsentrasjonsnivåene og konsentrasjonene er vist i Appendiks 2.



## Gruppe IV

- Prøveløsningene ble laget ved å blande alle stamløsningene i en målekolbe og lage en fortynningsrekke med tre konsentrasjonsnivåer fra 500 ng/ml til 50 ng/ml; 500, 250, 50 ng/ml.

Prøveløsningene fra Gruppe I og Gruppe II ble oppbevart i glassbeholdere i kjøleskap ved 2–8 °C. Prøveløsningene fra Gruppe III og Gruppe IV ble oppbevart i romtemperatur.

### 3.4.6 Eksternstandarder

Alle eksternstandardene ble laget i maursyre.

Eksternstandardene for Gruppe I, Gruppe II, Gruppe III og Gruppe IV ble laget i dobbel konsentrasjon med samme prosedyre som prøveløsningene.

Eksternstandardene ble oppbevart sammen med sine respektive prøveløsninger.

### 3.4.7 Biologisk matriks

Humant plasma ble kjøpt fra Blodbanken i Oslo, Oslo Universitetssykehus HF Ullevål og oppbevart i fryser ved -20 °C.

## 3.5 Instrumentelle betingelser

Det ble brukt to ulike UHPLC-MS/MS-systemer til analysene. Ett system ved Farmasøytisk institutt og ett system ved OUS.

### Gruppe I og Gruppe II

- Ekstrahert og analysert ved Farmasøytisk institutt.
- Optimalisert med hensyn på separasjon av analyttene og fragmentering av moderionene. Optimalisering av MS-parameterne ble gjort ved å injisere hver analytt direkte inn i MS og bruke tune-programmet *Thermo Tune Plus* til å finne riktig kollisjonsenergi og fragmenteringsbetingelser.

## Ekperimentelt

- Til deteksjon ble det brukt *selected reaction monitoring* (SRM). For å oppnå best mulig data med flest mulige datapunkter på hver topp, ble hver analytt tildelt et segment med optimale MS-betingelser.

### Gruppe III og Gruppe IV

- Ekstrahert ved Farmasøytisk institutt og analysert ved OUS.
- Det ble brukt UHPLC-MS/MS-metoder som var tilgjengelig ved OUS.
- Til deteksjon ble det brukt *Multiple reaction monitoring* (MRM).

### 3.5.1 Gruppe I

Analysene ble gjort på et UHPLC-MS/MS-instrument med ionefelle fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA). Utstyret er beskrevet i Tabell 5.

#### UHPLC-betingelser

Væskekromatografi ble utført på en Dionex UltiMate 3000 RS fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA).

Det ble brukt mobilfasesammensetning av metanol og maursyre og total analysetid var 9 minutter med kolonnetemperatur på 60 °C. Injeksjonsteknikk var *partial loop* med injeksjonsvolum 2 µl. Mobilfasesammensetning og gradient er vist i Tabell 11.

**Tabell 11** Gradienten og mobilfasesammensetningen brukt til UHPLC-analyse av Gruppe I

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	90,00	10,00	0,40
0,00	90,00	10,00	0,40
3,00	50,00	50,00	0,40
4,00	0,00	100,00	0,40
6,00	0,00	100,00	0,40
6,10	90,00	10,00	0,40
9,00	90,00	10,00	0,40
<b>Mobilfase A</b>		<b>Mobilfase B</b>	
Maursyre:metanol 95:5 (v/v)		Maursyre:metanol 5:95 (v/v)	

### MS/MS-betingelser

Massespektrometri ble utført på en LTQ XL lineær ionefelle fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA).

Ionisering ble gjort med elektropray i positiv modus:

Kapillærspenning	5 kV
Kapillærtemperatur	350 °C
Forstøvergass	Nitrogen (26 AU)
Tørkegass	Nitrogen (5 AU)

Analyttenes SRM-overganger er vist i Tabell 12.

**Tabell 12** SRM-overganger brukt til MS/MS-analyse av Gruppe I

Segment (min)	Analytt	Kollisjonsenergi (%)	Overgang (m/z)
Segment 1 (0,00–3,33)	Lidokain	21,00	234,71 > 85,40
Segment 2 (3,33–4,20)	Oksprenolol	23,00	265,75 > 247,60

### 3.5.2 Gruppe II

Analysene ble gjort på samme UHPLC-MS/MS-instrument som Gruppe I.

#### UHPLC-betingelser

Væskrokromatografien ble utført på en Dionex UltiMate 3000 RS fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA).

Det ble brukt mobilfasesammensetning av acetonitril og maursyre og total analysetid var 10 minutter med kolonnetemperatur på 60 °C. Injeksjonsteknikk var *partial loop* med injeksjonsvolum 2 µl. Mobilfasesammensetningen og gradienten er vist i Tabell 13.

**Tabell 13** Gradienten og mobilfasesammensetningen brukt til UHPLC-analyse av Gruppe II

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	90,00	10,00	0,40
0,00	90,00	10,00	0,40
5,00	50,00	50,00	0,40
7,00	0,00	100,00	0,40
8,00	0,00	100,00	0,40
8,10	90,00	10,00	0,40
10,00	90,00	10,00	0,40
<b>Mobilfase A</b>		<b>Mobilfase B</b>	
Maursyre:acetonitril 95:5 (v/v)		Maursyre:acetonitril 5:95 (v/v)	

Ekperimentelt

### MS/MS-betingelser

Massespektrometrien ble utført på en LTQ XL lineær ionefelle fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA).

Ionisering ble gjort med elektropray i positiv modus:

Kapillærspenning 5 kV  
Kapillærtemperatur 350 °C  
Forstøvergass Nitrogen (26 AU)  
Tørkegass Nitrogen (5 AU)

Analyttenes SRM-overganger er vist i Tabell 14.

**Tabell 14** SRM-overganger brukt til MS/MS-analyse av Gruppe II

Segment (min)	Analytt	Kollisjonsenergi (%)	Overgang (m/z)
Segment 1 (0,00–4,17)	Noskapin	15,5	413,91 > 219,53
Segment 2 (4,17–4,77)	Promazin	19,5	284,71 > 239,59 og 85,30
Segment 4 (5,97–10,0)	Amiodaron	26	645,50 > 572,3 og 445,47

### 3.5.3 Gruppe III

Analysene ble gjort ved OUS på et Waters Acquity Xevo TQ UPLC-MS/MS-instrument fra Waters (Milford, MA, USA).

### UHPLC-betingelser

Væskekromatografien ble utført på en Aquity™ Ultra Performance LC fra Waters (Milford, MA, USA).

Det ble brukt mobilfasesammensetning av ammoniumformat og metanol og, total analysetid var 16,0 minutter med kolonnetemperatur på 65 °C. Injeksjonsteknikk var *partial loop with needle overfill* med injeksjonsvolum 7,5 µl og et *overfill* volum på 3 µl. Mobilfasesammensetningen og gradienten er vist i Tabell 15.

**Tabell 15** Gradienten og mobilfasesammensetningen brukt til UHPLC-analyse av Gruppe III

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	97,50	2,50	0,50
14,00	25,00	75,00	0,50
14,01	5,00	95,00	0,50
15,00	5,00	95,00	0,50
15,01	97,50	2,50	0,50
<b>Mobilfase A</b>		<b>Mobilfase B</b>	
Ammoniumformat		Metanol	

**MS/MS-betingelser**

Massespektrometri ble utført på en Xevo trippel kvadrupol fra Waters (Milford, MA, USA).

Ionisering ble gjort med elektropray i positiv modus:

Kapillærspenning	3 kV
Desolvation gas flow	1000 liter/time (nitrogen)
Cone gas flow	80 liter/time
Desolvation temperatur	500 °C
Source temperatur	150 °C
Collision cell Pressure	3,0E <sup>-3</sup> mbar

Analyttenes MRM-overganger er vist i Tabell 16–Tabell 26.

**Tabell 16** MRM-overganger vindu 1

Analytt	Vindu 1		Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
	Starttid: 7,2 min	Sluttid: 8,5 min			
Klometiazol	Dwell time (s)				
	0,090	36	20	162,0 > 113,0	
Propranolol	0,020	32	18	260,2 > 116,0	
Venlafaksin	0,040	24	32	278,2 > 121,0	

**Tabell 17** MRM-overganger vindu 2

Analytt	Vindu 2		Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
	Starttid: 0,0 min	Sluttid: 15,0 min			
6-APB	Dwell time (s)				
	0,005	14	20	176,1 > 131,0	
2C-E	0,050	20	20	210,3 > 193,1	
Alfa-PVP	0,005	36	26	232,2 > 105,0	
MDPV	0,005	4	24	276,3 > 126,1	
Fentanyl	0,005	30	25	337,2 > 105,1	

**Tabell 18** MRM-overganger vindu 3

Analytt	Vindu 3	
	Starttid: 0,0 min	Sluttid: 15,0 min

## Ekspimentelt

Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Pentedron	0,005	18	22	192,2 > 132,0
3-fluorfenmetrazin	0,005	35	20	196,1 > 134,9
Etylenfenidat	0,005	28	22	248,2 > 174,1
AH-7921	0,020	28	16	329,2 > 284,2
Carfentanyl	0,005	30	31	395,4 > 112,8

**Tabell 19** MRM-overganger vindu 4

Vindu 4				
		Starttid: 4,0 min		
		Sluttid: 4,5 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang
Ketobemidon	0,090	36	24	248,2 > 201,0
O-desmetyltramadol	0,010	22	14	250,2 > 58,1

**Tabell 20** MRM-overganger vindu 5

Vindu 5				
		Starttid: 2,6 min		
		Sluttid: 4,2 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Vareniklin	0,050	38	20	212,1 > 183,1
Baklofen	0,070	20	23	214,1 > 151,0

**Tabell 21** MRM-overganger vindu 6

Vindu 6				
		Starttid: 9,4 min		
		Sluttid: 9,9 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Paroksetin	0,080	40	20	330,2 > 192,1

**Tabell 22** MRM-overganger vindu 7

Vindu 7				
		Starttid: 5,8 min		
		Sluttid: 7,2 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Petidin	0,010	35	20	248,2 > 220,2
Hydroksybupropion	0,040	18	22	256,2 > 167,0
Metoprolol	0,020	32	18	268,2 > 116,1
9-OH-risperidon	0,020	42	26	427,2 > 207,1

**Tabell 23** MRM-overganger vindu 8

Vindu 8				
		Starttid: 8,0		
		Sluttid: 10,2		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Mianserin	0,010	35	19	265,2 > 208,1
Doksepin	0,010	34	24	280,2 > 107,0
Prometazin	0,010	25	16	285,2 > 86,2
Citalopram	0,010	36	24	325,2 > 109,0
Klozapin	0,010	36	24	327,2 > 270,1
Haloperidol	0,010	38	24	376,3 > 165,0
Kvetiapin	0,010	35	20	384,2 > 253,1

**Tabell 24 MRM-overganger vindu 9**

Vindu 9		Starttid: 9,7 min Sluttid: 11,0 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Nortriptylin	0,015	30	15	264,2 > 233,1
Amitriptylin	0,015	32	22	278,2 > 105,0
Trimipramin	0,020	28	40	295,2 > 193,0
Duloksetin	0,020	10	4	298,2 > 154,0
Alimemazin	0,020	30	18	299,2 > 100,0
Fluoksetin	0,040	20	10	310,1 > 44,0
Levomepromazin	0,020	32	20	329,3 > 100,0
Hydroksyzin	0,010	25	20	375,2 > 201,1

**Tabell 25 MRM-overganger vindu 10**

Vindu 10		Starttid: 4,5 min Sluttid: 5,2 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Olanzapin	0,100	38	24	313,2 > 256,1

**Tabell 26 MRM-overganger vindu 11**

Vindu 11		Starttid: 10,7 min Sluttid: 12,0 min		
Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)	Overgang (m/z)
Sertralin	0,060	18	26	306,1 > 159,0
Klomipramin	0,050	28	18	315,2 > 86,0
Klorprotiksen	0,060	36	30	316,1 > 231,0

### 3.5.4 Gruppe IV

Analysene ble gjort på samme UHPLC-MS/MS-instrument som Gruppe III.

#### UHPLC-betingelser

Væskekromatografi ble utført på en Aquity™ Ultra Performance LC fra Waters (Milford, MA, USA).

Det ble brukt mobilfasesammensetning av ammoniumformat og metanol og total analysetid var 16 minutter med kolonnetemperatur på 65 °C. Injeksjonsteknikk var *partial loop with needle overfill* med injeksjonsvolum 7,5 µl og et *overfill* volum på 3 µl.. Mobilfasesammensetningen og gradienten er vist i Tabell 27.

**Tabell 27** Gradienten og mobilfasesammensetningen brukt til UHPLC-analyse av Gruppe IV

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	97,50	2,50	0,50
14,00	25,00	75,00	0,50
14,01	5,00	95,00	0,50
15,00	5,00	95,00	0,50
15,01	97,50	2,50	0,50
<b>Mobilfase A</b>		<b>Mobilfase B</b>	
Ammoniumformat		Metanol	

**MS/MS-betingelser**

Massespektrometri ble utført på en Xevo trippel kvadrupol fra Waters (Milford, MA, USA).

Ionisering ble gjort med elektropray i positiv modus:

Kapillærspenning	3 kV
Desolvation gas flow	1000 liter/time (nitrogen)
Cone gas flow	80 liter/time
Desolvation temperatur	500 °C
Source temperatur	150 °C
Collision cell Pressure	3,0E <sup>-3</sup> mbar

Analyttenes MRM-overganger vist i Tabell 28 og Tabell 29.

**Tabell 28** MRM-overganger vindu 8

Vindu 8	Starttid: 8,00 min Sluttid: 10,20 min			
	Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)
Prometazin	0,01	25,00	16,00	285,20 > 86,00

**Tabell 29** MRM-overganger vindu 9

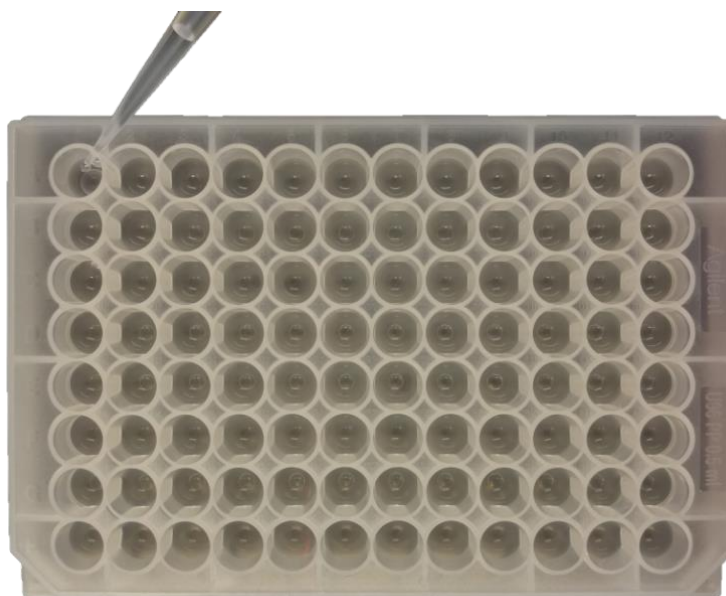
Vindu 9	Starttid: 9,70 min Sluttid: 11,00 min			
	Analytt	Dwell time (s)	Cone (V)	Coll (eV)
Trimipramin	0,020	28,000	40,000	295,20 > 193,00
Amitriptylin	0,015	32,000	22,000	278,20 > 105,00
Nortriptylin	0,015	30,000	15,000	264,20 > 233,10



## 3.6 Prosedyre for PALME-NPBD

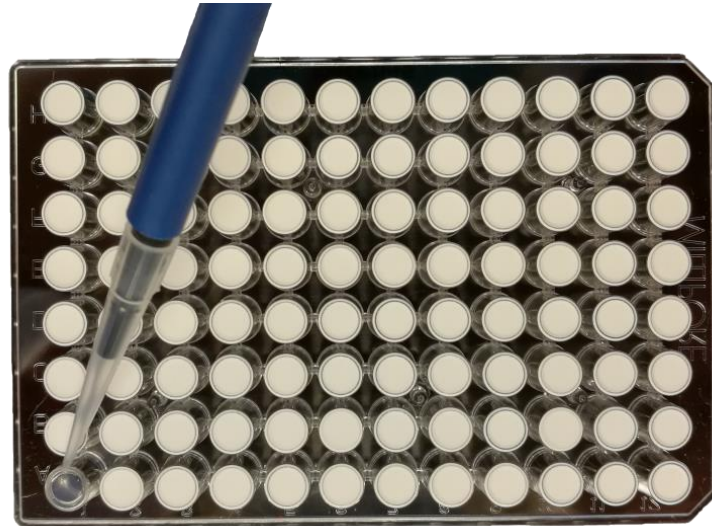
### 3.6.1 Ekstraksjonsmetode

PALME-metoden som ble testet er under utvikling for å ekstrahere basiske legemidler med  $\log P > 2$ , og blir heretter omtalt som *PALME-non-polar basic drugs* (PALME-NPBD). Ekstraksjonen ble utført med 96-brønnsplatene beskrevet i Tabell 7 og illustrert i Figur 8, Figur 9, Figur 10 og Figur 11.



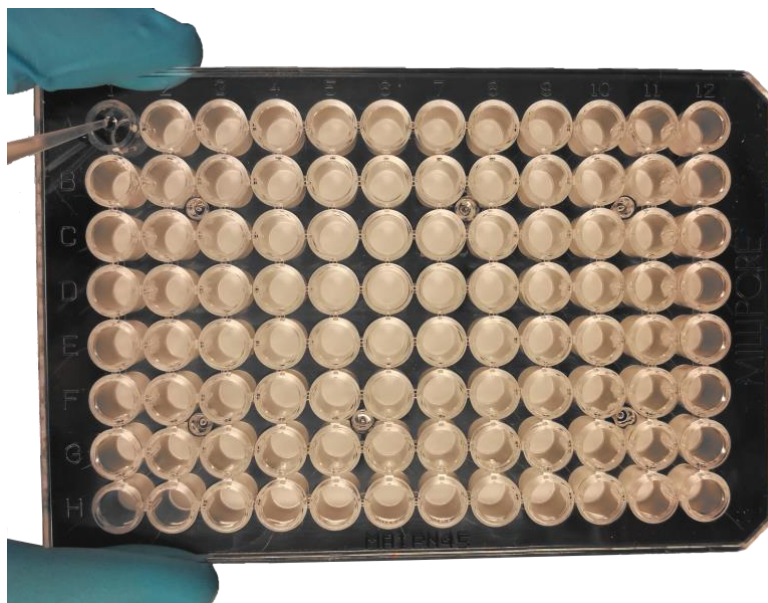
**Figur 8** Donorplate. *Plasma, metanol, vandig prøveløsning og karbonatbuffer ble tilsatt donorbrønnene i donorplaten*

Pipettering til en donorbrønn er vist i Figur 8. Det ble til donorbrønnene i donorplaten tilsatt i rekkefølge: 100  $\mu\text{l}$  humant plasma, 25  $\mu\text{l}$  metanol og 100  $\mu\text{l}$  vandig løsning med legemidler (prøveløsning). Til slutt ble 25  $\mu\text{l}$  0,1 M karbonatbuffer tilsatt til donorbrønnene. Dette utgjorde et totalvolum på 250  $\mu\text{l}$  (donorløsning). Donorplaten med donorløsningene ble satt til side mens akseptorplaten ble preparert med SLM.



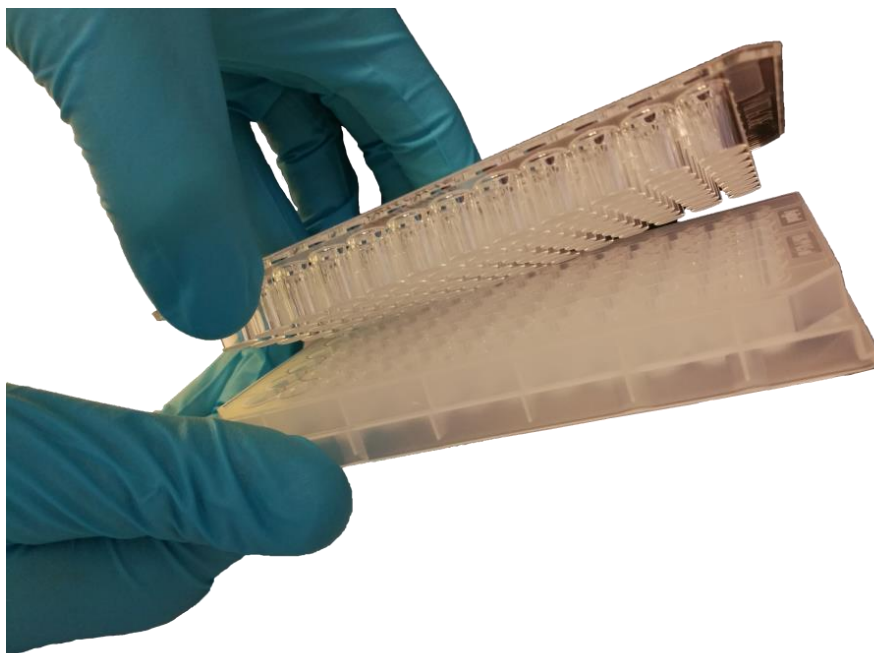
**Figur 9** Filter. Akseptorplaten ble vendt opp ned og organisk væske ble påført PVDF-membranen for å lage SLM

Påføringen av SLM er vist i Figur 9 og ble gjort ved å pipettere 3  $\mu$ l dodecylacetat inneholdene 1 % TOA (w/w) på PVDF-membranene i akseptorbrønnene som ble brukt. Akseptorplaten ble vendt opp ned for lettere å påføre organisk væske til å lage SLM. I løpet av kort tid ble den organiske væsken immobilisert i hele PVDF-membranens utstrekning.



**Figur 10** Akseptorplate. Akseptorplaten ble vendt rett vei etter påføring av SLM og det ble tilsatt akseptorløsning til akseptorbrønnene. Aluminiumteip ble limt over brønnene for å hindre søl og avdampning

Tilsetting av akseptorløsning er vist i Figur 10. Etter ett minutt ble akseptorplaten vendt rett vei og 50  $\mu$ l akseptorløsning ble tilsatt til hver akseptorbrønn som skulle bli brukt under ekstraksjonen. Akseptorløsningen bestod av maursyre. Aluminiumteip ble limt over hver akseptorbrønn som var i bruk for å hindre avdampning og søl under ekstraksjonen.



**Figur 11** Donor- og akseptorplate klemmes sammen. Platene ble klemt sammen og satt på en ristemaskin med 900 rpm i 45 minutter

Donorplaten og akseptorplaten ble deretter klemt sammen som vist i Figur 11, og satt på en ristemaskin med ristehastighet 900 rpm i 45 minutter. Etter ekstraksjonen hadde gått i 45 minutter, ble platene tatt av ristemaskinen og skilt fra hverandre. Aluminiumteipen ble brutt og hele volumet av akseptorløsningen ble overført direkte til UHPLC-vialer med en pipette.

Prøveløsningen på 100  $\mu$ l og akseptorløsningen på 50  $\mu$ l utgjorde en volumforskjell som ga PALME-NPBD mulighet for to ganger oppkonsentrering av analyttene.

### 3.6.2 Ekstraksjonsbetingelser

#### Donorløsning

Humant plasma ble tilsatt for å etterligne autentiske biologiske prøver. Metanol ble brukt for å hindre adsorpsjon til donorplaten. Karbonatbuffer pH 10,4 ble brukt for å undertrykke ioniseringen av analyttene slik at de befant seg på uladet form.

#### Væskemembran

Dodecylacetat med 1 % TOA (w/w) har vist seg å være egnet til PALME av lipofile, basiske legemidler og ble derfor også brukt i PALME-NPBD [11, 12]. Dodecylacetat har lav vannløselighet og høyt kokepunkt og TOA kan øke utbyttene og lineariteten for noen

## Ekperimentelt

analytter ved å maskere bindingssetene hvor det foregår uspesifikke bindinger mellom analytt og PVDF-membran [11, 12].

### Akseptorløsning

Maursyre ble brukt til å ionisere analyttene i akseptorløsningen og fordi maursyre var flyktig. Ioniseringen av analyttene dannet pH-gradienten i systemet og maursyren gjorde det mulig å injisere akseptorløsningene direkte i UHPLC-MS/MS.

### Ristehastighet og ekstraksjonstid

Det er tidligere vist at en ristehastighet på 900 rpm kan være optimalt [29]. Optimal ekstraksjonstid kan variere [7, 8, 11, 12, 28, 29], så i denne oppgaven ble ekstraksjonen utført i 45 minutter for å redusere total prøveopparbeidelsestid.

## 3.7 Forsøksoppsett

### 3.7.1 PALME-NPBD

Ekstraksjon med PALME-NPBD ble utført på Gruppe I–III hver for seg.

#### Gruppe I

Fortynningsrekken til prøveløsningene bestod av åtte konsentrasjonsnivåer fra 10–1000 ng/ml og ble ekstrahert i fire paralleller.

Fortynningsrekken til eksterstandardene bestod av åtte konsentrasjonsnivåer som tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte av prøveløsningene. Eksterstandardene ble ikke ekstrahert, men injisert direkte i UHPLC-MS/MS hvor hver eksterstandard ble injisert to ganger.

#### Gruppe II

Fortynningsrekken til prøveløsningene bestod av åtte konsentrasjonsnivåer fra 10-1000 ng/ml og ble ekstrahert i fire paralleller.

Fortynningsrekken til eksterstandardene bestod av åtte konsentrasjonsnivåer som tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte av prøveløsningene. Eksterstandardene ble ikke ekstrahert, men injisert direkte i UHPLC-MS/MS hvor hver eksterstandard ble injisert to ganger.

### Gruppe III

Fortynningsrekken til prøveløsningene bestod av 9 konsentrasjonsnivåer fra en tiendedel til en sekshundrededel av opprinnelig konsentrasjon og ble ekstrahert i fire paralleller.

Fortynningsrekken til eksterstandardene bestod av 9 konsentrasjonsnivåer som tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte av prøveløsningene. Eksterstandardene ble ikke ekstrahert, men injisert direkte i UHPLC-MS/MS hvor hver eksterstandard ble injisert tre ganger.

#### 3.7.2 PALME-NPBD med DMSO i akseptorløsningen

Det ble gjort PALME-NPBD med tre modifiserte akseptorløsninger; 10, 25 og 50 % (v/v) DMSO i maursyre.

### Gruppe IV

Fortynningsrekken til prøveløsningene bestod av tre konsentrasjonsnivåer fra 50–500 ng/ml og ble ekstrahert i fire paralleller.

Fortynningsrekken til eksterstandardene bestod av tre konsentrasjonsnivåer som tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte av prøveløsningene. Eksterstandardene ble ikke ekstrahert, men injisert direkte i UHPLC-MS/MS hvor hver eksterstandard ble injisert én gang.

## 3.8 Vurdering av PALME-NPBD

PALME-NPBD ble vurdert etter fire kriterier: utbytte, konsentrasjonsuavhengig utbytte, linearitet og repeterbarhet.

### 3.8.1 Utbytte

Utbyttet fra de ekstraherte prøveløsningene ble beregnet for hver parallell av hver analytt ved å dele signalintensiteten (arealet under kurven) med signalintensiteten til korresponderende eksterstandard, vist i Formel 4. Kravet ble satt til utbytte  $\geq 40$  %.

For Gruppe III ble utbyttet beregnet ved å bruke topphøyden som signalintensitet.

**Formel 4** 
$$R = \frac{C}{C_{STD}} 100 \%$$

$$R = \text{utbytte}$$
$$C = \text{areal eller topphøyde for prøveløsning}$$
$$C_{STD} = \text{areal eller topphøyde for eksternstandard}$$

### 3.8.2 Konsentrasjonsuavhengig utbytte

Konsentrasjonens effekt på utbyttet ble vurdert med Pearsons korrelasjonskoeffisient og hypotesetesting med signifikansnivå 0,01. Det ble formulert en nullhypotese ( $H_0$ ) og alternativhypotese ( $H_A$ ):

$H_0$ : *Det er ingen korrelasjon mellom konsentrasjonen og utbyttet*

$H_A$ : *Det er en korrelasjon mellom konsentrasjonen og utbyttet*

$$\alpha = 0,01$$

$$p < 0,01 \text{ forkastes nullhypotesen}$$

Pearsons korrelasjonskoeffisient og p-verdien ble beregnet ved hjelp av RStudio versjon 1.1.419. Kravet var at det ikke skulle være noen korrelasjon mellom konsentrasjonen og utbyttet.

### 3.8.3 Linearitet

Linearitetskurvene ble laget for både prøveløsningene og eksternstandardene ved å plote signalintensiteten mot den teoretiske konsentrasjonen. Enkel lineær regresjon ble utført for å bestemme  $r^2$ , og linearitetskravet for prøvene ble satt til  $r^2 \geq 0,98$ .

### 3.8.4 Repeterbarhet

Repetierbarheten ble vurdert ved å beregne gjennomsnittlig relativt standardavvik (RSD) for hvert konsentrasjonsnivå for hver analytt. Gjennomsnittet av alle RSD for hver analytt ble brukt som mål på repeterbarhet og kravet ble satt til  $\leq 20 \%$  gjennomsnittlig RSD.

## 4 Resultater og diskusjon

En blanding av 46 legemidler og rusmidler (Gruppe I–III) ble ekstrahert fra plasma med PALME-NPBD ( $n = 4$ ). Kromatogrammer for konsentrasjonsnivå 10 ligger i Appendiks 3..37 av analyttene ble valgt på bakgrunn av at de var monobaser med  $\log P > 2$ , og det var forventet at de skulle gi resultater som var innenfor de definerte kravene. De resterende ni analyttene var enten monobaser med  $\log P < 2$  eller zwitterioner med både sure og basiske grupper. Disse hadde andre fysikalsk-kjemiske egenskaper enn PALME-NPBD var beregnet for, og det var ikke forventet at de skulle være innenfor kravene. De ble likevel tatt med for å undersøke hvordan de ville oppføre seg i PALME-NPBD.

Resultatene ble vurdert med hensyn på analyttenes utbytte, utbyttets konsentrasjonsuavhengighet, linearitet og presisjon etter følgende kriterier:

- Utbytte  $\geq 40$  %
- Konsentrasjonen skal ikke ha effekt på utbyttet
- $r^2 \geq 0,98$
- RSD  $\leq 20$  %

Til slutt ble det diskutert en mulig årsak til hvorfor noen analytter oppfylte kravene og andre ikke. Det første analyttene ble vurdert på var utbytte.

### 4.1 Utbytte

Hvis utbyttet i PALME-NPBD er lavt, kan man risikere å få så lave konsentrasjoner i akseptorløsningen at disse vil ligge under *lower limit of quantification* (LOQ). Dette er problematisk i kvantitative analyser, ettersom LOQ er den laveste konsentrasjonen en analytt må ha for at man med sikkerhet skal kunne kvantifisere den. I tillegg er tidligere erfaringer med PALME at presisjonen blir svakere når utbyttet er lavt. Kravet til utbytte ble derfor satt til  $\geq 40$  %.

Utbyttene er presentert i Tabell 30. Tabellen er sortert etter analyttenes  $\log P$  i avtagende rekkefølge. Av de 37 monobasiske analyttene med  $\log P > 2$ , var utbyttet  $\geq 40$  % for 26

## Resultater og diskusjon

analytter. Nederst i tabellen er analyttene med  $\log P < 2$  og analyttene med både sur og basisk gruppe vist.

**Tabell 30** Analyttene og deres respektive utbytter. Analyttene innenfor kravet er merket med en hake. <sup>1</sup>analytter fra Gruppe I; <sup>2</sup>analytter fra Gruppe II

Komponent	Status	log P	Utbytte
<sup>2</sup> Amiodaron		7,64	4 %
Sertralin	✓	5,15	52 %
Klorprotiksen		5,07	27 %
Klomipramin		4,88	29 %
Amitriptylin		4,81	39 %
Trimipramin		4,76	35 %
Nortriptylin	✓	4,43	54 %
Alimemazin		4,41	35 %
Prometazin		4,29	35 %
Levomepromazin		4,25	30 %
Duloksetin	✓	4,20	60 %
Fluoksetin	✓	4,17	59 %
AH-7921	✓	4,00	64 %
<sup>2</sup> Promazin	✓	3,93	60 %
Doksepin	✓	3,84	58 %
Mianserin	✓	3,83	63 %
Fentanyl	✓	3,82	69 %
Citalopram	✓	3,76	69 %
Carfentanyl	✓	3,67	63 %
Haloperidol	✓	3,66	69 %
Hydroksyzin	✓	3,41	62 %
Klozapin	✓	3,40	85 %
Olanzapin	✓	3,39	53 %
alfa-PVP	✓	3,36	60 %
Paroksetin	✓	3,15	63 %
MDPV	✓	2,99	73 %
<sup>1</sup> Lidokain	✓	2,84	101 %
Kvetiapin	✓	2,81	67 %
Venlafaksin	✓	2,74	81 %
Etylenfenidat	✓	2,61	82 %
Propranolol	✓	2,58	66 %
Pentedron	✓	2,58	66 %
<sup>2</sup> Noskapin		2,58	7 %
Petidin	✓	2,46	82 %
Hydroksybupropion	✓	2,22	57 %
<sup>1</sup> Oksprenolol		2,17	29 %
2C-E		2,03	32 %
Analytter med $\log P < 2$			
6-APB	✓	1,96	65 %



3-Fluorfenmetrazin	✓	1,93	57 %
Klometiazol		1,77	20 %
9-OH-risperidon		1,76	30 %
Metoprolol		1,76	31 %
O-desmetyltramadol		1,72	31 %
Vareniklin		1,01	5 %
Baklofen		-0,78	-
Analytter med sur og basisk gruppe (zwitterioner)			
Ketobemidon		2,49	18 %
O-desmetyltramadol		1,72	31 %
Baklofen		-0,780	-

*Analytter som ikke ble detektert er merket –*

Av resultatene kan det se ut som utbyttene blir lavere ved de høyeste og laveste log P-verdiene. Av alle analyttene med utbytte under kriteriet, ligger omtrent halvparten blant analyttene med høyest log P og omtrent halvparten blant analyttene med lavest log P.

Hypotesen om at høy log P begrenser utbyttet kan forklares med at fordelingen av analyttene fra donorløsningen til SLM er høy, mens fordelingen fra SLM til akseptorløsningen er lav. Akseptorløsningen er et vandig medium og løseligheten til analyttene med høy log P er sannsynligvis lavere i akseptorløsningen enn i SLM.

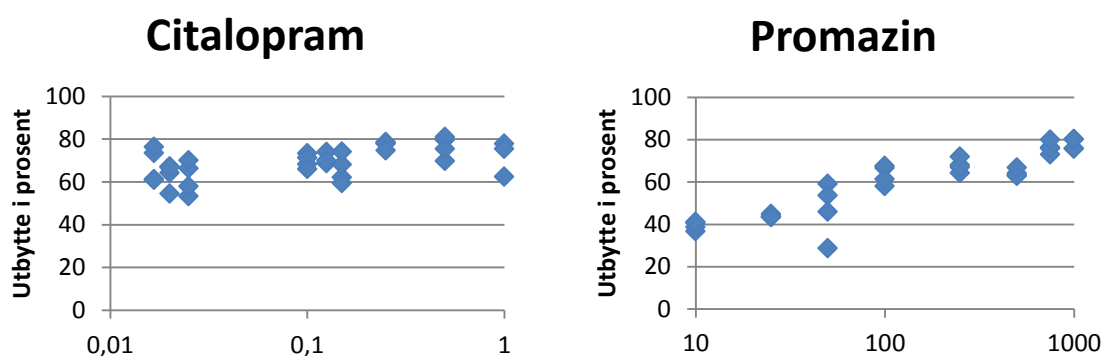
Hypotesen om at lav log P begrenser utbyttet kan forklares med at fordelingen av analyttene fra donorløsningen til SLM er lav; da vil mengden analytt som diffunderer inn i akseptorløsningen også være lav. Denne hypotesen kan begrunnes med å se på utbyttene til analyttene med  $\log P < 2$ . Av åtte analytter med  $\log P < 2$ , har seks et utbytte under kriteriet. Årsaken til at to analytter ga utbytte  $> 40\%$  kan være deres relativt høye log P, som er tett opp under 2, kombinert med få hydrofile funksjonelle grupper.

Zwitterionene var ionisert i donorløsningen og hadde et utbytte som gjenspeilte deres hydrofile egenskaper. Ketobemidon og O-desmetyltramadol er svakt sure fenoler med pKa rundt 9,5 og var delvis ionisert i donorløsningen som hadde en pH på 10,4. Fordelingen fra donorløsningen til SLM var av den grunn begrenset, men en liten del ble ekstrahert inn i SLM og ut i akseptorløsningen. Syregruppen til baklofen har en pKa på 3,9 og var fullstendig ionisert i det basiske miljøet i donorløsningen og ble ikke ekstrahert.

Totalt var det 28 analytter som oppfylte kravet satt til utbytte, og disse ble vurdert videre med hensyn på utbytte og konsentrasjonsuavhengighet.

## 4.2 Konsentrasjonsuavhengig utbytte

I kvantitative analyser måles analyttens signal ( $y$ ) som er avhengig av analyttens konsentrasjon ( $x$ ) i prøven. Så langt det lar seg gjøre skal dette være et lineært forhold; det vil si at  $y$  skal være proporsjonal med  $x$ . Dersom dette er tilfellet vil utbyttene til analyttene, som er beregnet basert på signalet, være konstante og uavhengige av analyttens konsentrasjon i prøven; grafisk ville dette sett ut som en rett, horisontal strek når utbyttet plottes mot konsentrasjonen. Det vil alltid være variasjon i utbyttene, men om variasjonen er statistisk signifikant er vanskelig å si kun basert på visuell tolkning. I Figur 12 er utbyttet ( $y$ ) plottet mot konsentrasjon ( $x$ ) for citalopram og promazin. Utbyttet for citalopram er ikke signifikant korrelert med de ulike konsentrasjonene, mens utbyttet for promazin viser en økende tendens med økende konsentrasjon.



**Figur 12** Eksempel på en konsentrasjonsuavhengig (citalopram,  $p$ -verdi  $> 0,01$ ) og en konsentrasjonsavhengig (promazin,  $p$ -verdi  $< 0,01$ ) analytt. Utbyttet er plottet mot konsentrasjonen hvor  $x$ -aksen er logaritmisk for bedre visuell fremstilling

Begrunnelsen for å gjøre hypotesetesting er for å finne ut om variasjonen er signifikant eller ikke for de analyttene som ikke har et klart mønster. Det ble derfor formulert en null- og alternativhypotese som ble testet ved hjelp av Pearsons korrelasjonskoeffisient  $r$ .

$H_0$ : Det er ingen korrelasjon mellom konsentrasjonen og utbyttet

$H_A$ : Det er en korrelasjon mellom konsentrasjonen og utbyttet

$$\alpha = 0,01$$

$p < 0,01$  forkastes nullhypotesen

Pearsons korrelasjonskoeffisient måler styrken og retningen av et lineært forhold mellom to variabler ved å trekke en linje som passer best til alle punktene når  $y$  plottes mot  $x$ . Hvis

korrelasjonskoeffisienten  $r$  er nær 1,0, betyr det at det er et sterkt lineært forhold mellom  $y$  og  $x$ , hvor  $y$  øker proporsjonalt med  $x$ . Motsatt vil en  $r$ -verdi som er nær -1,0 bety at det er et sterkt lineært forhold mellom  $y$  og  $x$ , hvor  $y$  synker proporsjonalt med  $x$ . Korrelasjonskoeffisienten kan ikke brukes til å forutsi  $y$  ved en gitt  $x$ , siden den kun måler om det er en korrelasjon mellom  $y$  og  $x$ .

Tabell 31 viser analyttene som tilfredsstilte kravet satt til utbytte i forrige avsnitt, og er sortert etter analyttenes avtagende  $\log P$ . Tabellen viser at 14 av analyttene med  $\log P > 2$  hadde en  $p$ -verdi over signifikansnivået ( $p > 0,01$ ). For disse 14 analyttene ble nullhypotesen beholdt, og det ble konkludert med at konsentrasjonen ikke hadde effekt på utbyttet. Analyttene med  $\log P < 2$  hadde også  $p$ -verdier over signifikansnivået, og nullhypotesen ble beholdt også for disse. Analyttene som oppfylte kravet er merket med en hake.

**Tabell 31** Analyttene med deres  $p$ -verdier

<sup>1</sup>korrelasjonskoeffisient

<sup>2</sup> $p < 0,01$  tilsier at konsentrasjonen har effekt på utbyttet

Komponent	Status	$\log P$	<sup>1</sup> $r$	<sup>2</sup> $p$ -verdi
Sertralin		5,15	0,60	< 0,01
Nortriptylin	✓	4,43	0,26	0,160
Duloksetin	✓	4,20	-0,087	0,623
Fluoxetin	✓	4,17	0,064	0,738
AH-7921	✓	4,00	0,28	0,113
<sup>2</sup> Promazin		3,93	0,81	< 0,01
Doxepin		3,84	0,82	< 0,01
Mianserin		3,83	0,73	< 0,01
Fentanyl	✓	3,82	0,42	0,0143
Citalopram	✓	3,76	0,39	0,0234
Carfentanyl		3,67	0,57	< 0,01
Haloperidol	✓	3,66	-0,15	0,393
Hydroksyzin		3,41	0,84	< 0,01
Klozapin	✓	3,40	0,053	0,781
Olanzapin	✓	3,39	-0,16	0,369
alfa-PVP	✓	3,36	0,29	0,0956
Paroksetin	✓	3,15	0,42	0,0203
MDPV	✓	2,99	0,27	0,129
<sup>1</sup> Lidokain	✓	2,84	-0,37	0,0611
Kvetiapin		2,81	-0,59	< 0,01
Venlafaksin		2,74	0,67	< 0,01
Etylenfenidat	✓	2,61	0,25	0,153
Propranolol		2,58	0,82	< 0,01
Pentadron		2,58	0,48	< 0,01

## Resultater og diskusjon

Petidin		2,46	0,76	< 0,01
Hydroksybupropion		2,22	0,50	< 0,01
Analytter med $\log P < 2$				
6-APB	✓	1,96	-0,12	0,498
3-Fluorfenmetrazin	✓	1,93	0,18	0,365

Av resultatene ser det ikke ut til å være en spesiell trend som kan forklares ved hjelp av  $\log P$ , men strukturene til noen av analyttene med konsentrasjonsavhengig utbytte har noen likhetstrekk. Seks av analyttene har minst én benzenring, med en hydrokarbonkjede bundet til seg med et tertiært eller sekundært amin i enden av kjeden. To av analyttene har den samme strukturen, men med en primær alkohol i enden. Disse lange karbonkjedene med en funksjonell gruppe ytterst kan tenkes å være lett tilgjengelig for adsorpsjon til PALME-systemet, og med økende konsentrasjon av analytt kan flere molekyler adsorbere og vise seg som konsentrasjonsavhengig utbytte.

Videre ble analyttene som tilfredsstilte kravet om konsentrasjonsuavhengighet vurdert på lineariteten mellom signalet i detektoren og konsentrasjonen i prøven.

### 4.3 Linearitet

Innen legemiddelanalyse er det viktig at signalet til en analytt ( $y$ ) er proporsjonal med analyttens konsentrasjon ( $x$ ) i prøven for å kunne kvantifisere ukjente prøver. Hvis dette ikke er tilfellet og lineariteten ikke er innenfor et visst krav, kan ikke metoden brukes til kvantitative analyser.

Lineariteten beregnes med minste kvadraters metode og rapporteres som bestemmelseskoeffisienten  $r^2$ . Koeffisienten forteller hvor stor andel av spredningen langs  $y$ -aksen som kan forklares ved endring i  $x$ -verdiene. En  $r^2 = 0,98$  betyr at 98 % av økningen i signalstyrken ( $y$ ) er grunnet høyere konsentrasjon i prøven ( $x$ ). I denne oppgaven ble kravet til linearitet satt til å være  $r^2 \geq 0,98$ , fordi dette var et forsøk på å teste en potensiell generisk metode som ikke var optimalisert og klar for validering.

Lineariteten til analyttene er vist i Tabell 32 og er rangert etter analyttenes avtagende  $\log P$ .

**Tabell 32** Analyttene og deres  $r^2$ . Analyttene innenfor kravet er merket med en hake

Komponent	Status	$\log P$	$r^2$
Nortriptylin		4,43	0,93

Duloksetin		4,20	0,96
Fluoksetin		4,17	0,95
AH-7921		4,00	0,93
Fentanyl	✓	3,82	0,99
Citalopram	✓	3,76	0,98
Haloperidol		3,66	0,97
Klozapin	✓	3,40	0,99
Olanzapin	✓	3,39	0,98
alfa-PVP		3,36	0,97
Paroksetin	✓	3,15	0,99
MDPV	✓	2,99	0,98
<sup>1</sup> Lidokain	✓	2,84	0,99
Etylenfenidat	✓	2,61	0,98
Analytter med log P < 2			
6-APB	✓	1,96	0,99
3-Fluorfenmetrazin	✓	1,93	0,98

Av analyttene med  $\log P > 2$ , hadde 8 analytter  $r^2 \geq 0,98$ . Det kan se ut som om det var en sammenheng mellom høy  $\log P$  og svak lineariteten, ettersom de fire analyttene med høyest  $\log P$  ikke oppfylte kravet. Hypotesen kan begrunnes med at veldig hydrofobe analytter i større grad kan adsorberes til PVDF-membranen gjennom uspesifikke bindinger. Dodecylacetat har vist seg å være effektiv til å ekstrahere upolare, basiske legemidler, men uspesifikk binding til membranen er observert med denne som SLM [29]. Dette var et potensielt problem det ble tatt høyde for i starten av oppgaven ved å bruke 1 % (w/w) TOA i SLM for å maskere bindingssetene, men det er tidligere vist at dette ikke er en optimal løsning på problemet og at det ikke har effekt på alle analytter [11].

Analyttene med lavere  $\log P (< 4)$ , ser generelt ut til ikke å være påvirket av denne effekten og de fleste ble ekstrahert med linearitet innenfor kravet. Analyttene med  $\log P < 2$  ble også ekstrahert med linearitet innenfor kravet.

## 4.4 Repeterbarhet

Repeaterbarhet er et mål på metodens presisjon (spredning i analyseresultater) og angis som relativt standardavvik (RSD). Kravet for RSD ble i denne oppgaven satt til å være  $\leq 20$  %.

Analyttenes RSD er vist i Tabell 33 og er sortert etter analyttenes  $\log P$  i avtagende rekkefølge. Av 8 analytter (monobaser,  $\log P > 2$ ) hadde 8  $RSD \leq 20$  %.

**Tabell 33** Analyttene og deres RSD. Analyttene innenfor kravet er merket med en hake

Komponent	Status	log P	<sup>1</sup> RSD
Fentanyl	✓	3,82	15 %
Citalopram	✓	3,76	8 %
Klozapin	✓	3,40	4 %
Olanzapin	✓	3,39	7 %
Paroksetin	✓	3,15	7 %
MDPV	✓	2,99	11 %
<sup>1</sup> Lidokain	✓	2,84	3 %
Etylenfenidat	✓	2,61	13 %
Analytter med log P < 2			
6-APB		1,96	26 %
3-Fluorfenmetrazin		1,93	59 %

<sup>1</sup>n = 4

Av analyttene med log P > 2, var alle innenfor RSD-kravet, mens ingen av analyttene med log P < 2 tilfredsstilte RSD-kravet. I likhet med linearitet, kan RSD påvirkes av uspesifikke bindinger til PVDF-membranen, men siden analyttene med log P < 2 hadde tilfredsstillende linearitet kan det også være andre årsaker. Disse analyttene representerer et ytterpunkt for hvilke log P-verdier PALME-NPBD var beregnet på og årsaken kan derfor være at de hadde for lav log P og for varierende fordeling inn til SLM til å gi repeterbare utbytter.

Analyttene som oppfylte RSD-kravet oppfylte også de andre kravene. Videre diskuteres en mulig årsak til at akkurat disse analyttene ga tilfredsstillende resultater.

## 4.5 Polart overflateareal som en forklaringsmodell

*Polar surface area* (PSA) er overflatearealet i et molekyl som opptas av nitrogen- og oksygenatomer, og hydrogenatomene bundet til dem [34]. PSA måles i Å<sup>2</sup> og reflekterer molekylets polaritet og hydrogenbindingskapasitet, og er blant annet vist å ha betydning for passasje over blod-hjerne-barrieren og cellemembraner [35, 36].

Innen legemiddelkjemi er et molekyls absorpsjon gjennom cellemembraner i tarmens epitel viktig å undersøke under *drug discovery*-fasen for å se om et potensielt legemiddel har høy nok absorpsjon ved oral administrasjon. En velkjent modell som brukes til å forutsi et molekyls absorpsjon er *Lipinskis rule of 5* [37]. En mye brukt *in vitro* modell til å forutsi *in vivo*-absorpsjon er Caco-2-modellen som bruker levende celler, men datasimulerte modeller blir mer og mer brukt til dette formålet [38]. En slik datasimulert modell bruker et molekyls

forhold mellom PSA og log P til å forutsi grad av passiv absorpsjon over cellemembranen [39]. En annen *in vitro*-modell som også brukes til å forutsi passiv absorpsjon over cellemembraner er *Parallel artificial membrane permeability assay* (PAMPA), som i likhet med PALME gjøres i 96-brønns-format i et tre-fase-system [40]. Til å skille donorløsningen og akseptorløsningen bruker PAMPA en membran av lipider løst i for eksempel dodekan for å etterligne en cellemembran, men det har også blitt brukt ren heksadekan.

Siden både den datasimulerte modellen og PAMPA kan brukes til å forutsi passiv absorpsjon og på grunn av likhetene mellom PAMPA og PALME, var det interessant å undersøke betydningen av PSA/log P for analyttene som ble ekstrahert med PALME-NPBD.

Tabell 34 viser alle 46 analyttene og deres PSA, log P og PSA/log P-forhold; sortert etter økende PSA/log P-forhold. Tabellen viser også hvilke 8 analytter som var innenfor alle kravene. Ingen av zwitterionene eller analyttene med log P < 2 var innenfor kravene.

**Tabell 34** Oversikt over analyttene og deres PSA/log P-forhold. Analyttene som oppfylte alle kravene er merket med en hake

<sup>1</sup>analytter fra Gruppe I

<sup>2</sup>analytter fra Gruppe II

Komponent	Status	PSA/log P	PSA (Å <sup>2</sup> )	log P
Klorprotiksen		0,64	3,24	5,07
Amitriptylin		0,67	3,24	4,81
Klomipramin		1,33	6,48	4,88
Trimipramin		1,36	6,48	4,76
Alimemazin		1,47	6,48	4,41
Prometazin		1,51	6,48	4,29
<sup>2</sup> Promazin		1,65	6,48	3,93
Mianserin		1,69	6,48	3,83
Sertralin		2,34	12,03	5,15
Nortriptylin		2,72	12,03	4,43
Doksepin		3,25	12,47	3,84
Levomepromazin		3,70	15,71	4,25
Duloksetin		5,06	21,26	4,20
Fluoksetin		5,10	21,26	4,17
<sup>2</sup> Amiodaron		5,59	42,68	7,64
alfa-PVP		6,05	20,30	3,36
Fentanyl	✓	6,16	23,55	3,82
AH-7921		8,08	32,30	4,00
Klozapin	✓	9,08	30,87	3,40
Olanzapin	✓	9,11	30,87	3,39
Citalopram	✓	9,65	36,26	3,76

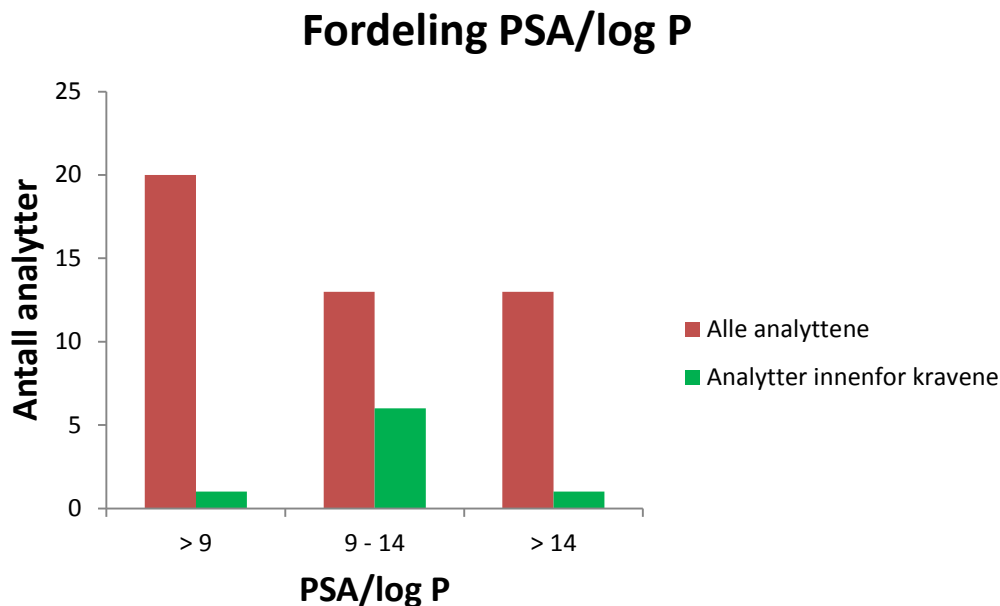
## Resultater og diskusjon

Hydroksyzin		10,54	35,94	3,41
Haloperidol		11,08	40,54	3,66
Pentedron		11,28	29,10	2,58
<sup>1</sup> Lidokain	✓	11,39	32,34	2,84
Venlafaksin		11,93	32,70	2,74
Petidin		12,01	29,54	2,46
Paroksetin	✓	12,61	39,72	3,15
MDPV	✓	12,98	38,80	2,99
Carfentanyl		13,57	49,80	3,67
Etylenfenidat	✓	14,67	38,30	2,61
Propranolol		16,08	41,49	2,58
Kvetiapin		17,19	48,30	2,81
2C-E		21,92	44,50	2,03
Hydroksybupropion		22,22	49,33	2,22
<sup>1</sup> Oksprenolol		23,37	50,72	2,17
<sup>2</sup> Noskapin		29,34	75,69	2,58
Analytter med log P < 2,00				
Baklofen		-81,18	63,32	-0,78
Klometiazol		7,28	12,89	1,77
3-Fluorfenmetrazin		11,04	21,30	1,93
6-APB		20,00	39,20	1,96
O-desmetyltramadol		25,41	43,70	1,72
Metoprolol		28,82	50,72	1,76
Vareniklin		37,44	37,81	1,01
9-OH-risperidon		46,69	82,17	1,76
Zwitterioner				
Baklofen		-81,18	63,32	-0,78
Ketobemidon		16,28	40,54	2,49
O-desmetyltramadol		25,41	43,70	1,72

Foreløpig ser det ut til at analytter med log P mellom 2,5 og 4 og PSA 23,55–39,72 Å<sup>2</sup> oppfyller alle kravene og er dermed egnede analytter for PALME-NPBD. Dette samsvarer med tidligere litteratur hvor det er vist at basiske analytter med log P > 2 er egnede kandidater for ekstraksjon med PALME [29]. Likevel ble ikke de fleste analyttene ekstrahert med tilfredsstillende resultater. En fremgangsmåte for å finne ut hvorfor dette var tilfellet var å se på forholdet mellom PSA og log P. Alle 46 analyttene hadde et PSA/log P-forhold mellom -81,18 og 46,69; denne fordelingen er vist i Figur 13. Fordelingen til de 8 analyttene som var innenfor kravene er vist i samme figur og viser at de fleste hadde et PSA/log P-intervall på 9–14. Figuren viser også at mange analytter hadde PSA/log P < 9, og kan bety at selv om log P ligger i riktig område, må PSA være 9–14 ganger høyere for å få tilfredsstillende



ekstraksjoner. I tillegg kan det se ut som PSA ikke kan være for høy, ettersom polare analytter har lav fordeling inn i SLM.



**Figur 13** Fordelingen av PSA/log P for 46 analytter sammenlignet med fordelingen til analyttene som var innenfor kravene. 46 % av analyttene med PSA/log P 9–14 var innenfor kravene. For PSA/log P < 9 og PSA/log P > 14 var tallene henholdsvis 5 % og 8 %

Den datasimulerte modellen som bruker PSA og log P til å forutsi passiv absorpsjon ble brukt som et hjelpemiddel til å prøve å forklare og forstå hvorfor analytter med et visst PSA/log P-forhold ga resultater som var innenfor alle kravene, mens analyttene som ikke hadde dette forholdet ga resultater som ikke var innenfor kravene.

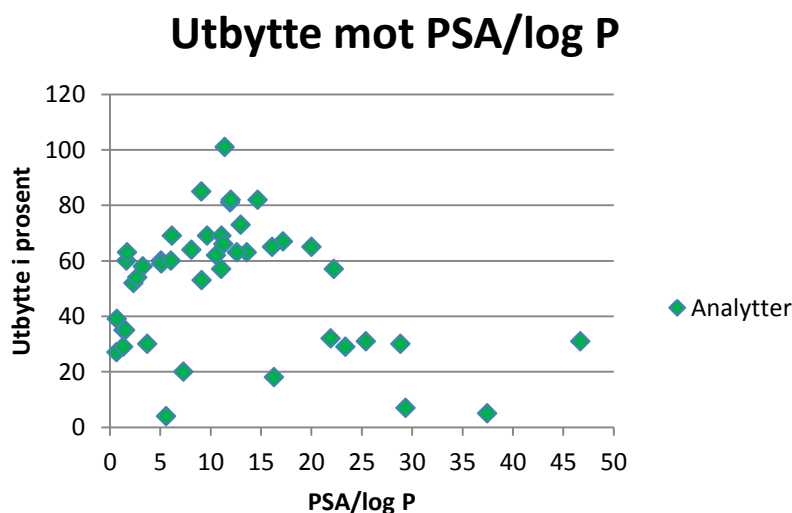
Tarmens cellemembran og SLM i PALME er ulike, slik at den datasimulerte modellen ikke kan overføres direkte til å forutsi hvilke analytter som er egnede kandidater for PALME. I tarmen diffunderer molekyler passivt både transcellulært og paracellulært, og modellen viser derfor at molekyler med et stort spenn av PSA/log P-forhold kan ha høy grad av absorpsjon. Siden SLM i PALME er mye mindre kompleks enn en cellemembran, er dette spennet sannsynligvis for stort for PALME. Uavhengig av dette bygger teorien i modellen på at kombinasjonen av lipofile van der Waalske og hydrofile H-bindinger mellom membran og molekyl er viktig for effektiv diffusjon i cellemembranen [39]. Det trengs en bredere karakteristikk av molekylet enn log P, siden denne stort sett brukes til å beskrive lipofilisitet og ikke hydrofilisitet. Modellen går ut i fra at forholdet PSA/log P er viktigere enn en selvstendig log P. Denne teorien stemmer overens med tidligere PALME-forsøk hvor man har

## Resultater og diskusjon

sett at tilsetning av ioniske bærere i SLM kan øke ekstraksjonsutbyttet og gi sterkere linearitet; en av årsakene kan være på grunn av hydrofile bindinger [11, 29].

Totalt var det 29 monobaser med  $\log P > 2$  som ikke oppfylte kravene selv om man regnet med at alle var egnede kandidater for PALME-NPBD, og 17 av disse viste seg å ha et PSA/ $\log P$ -forhold som var  $< 9$ ; det vil si at de ble valgt ut på bakgrunn av  $\log P$ , men sannsynligvis ikke ga tilfredsstillende resultater på grunn av for lav PSA. Seks av de 29 analyttene hadde PSA/ $\log P > 14$  og var sannsynligvis for polare. Hvis analyttene blir for lipofile (høy  $\log P$  og lav PSA) vil de sannsynligvis fordele seg inn i SLM, men ikke ut i akseptorløsningen. Omvendt kan det tenkes at for lav  $\log P$  kombinert med høy PSA gir lav fordeling inn i SLM og således lavt utbytte i akseptorløsningen. Dog var 50 % av monobasene med  $\log P > 2$  og PSA/ $\log P$  mellom 9–14, likevel ikke innenfor alle kravene. Dette var sluttresultatene etter en utvelgelsesprosess av analyttene. Siden PALME-NPBD ikke var optimalisert, kan fremtidig optimalisering sannsynligvis øke antallet analytter som oppfyller kravene.

Av den grunn kan det gi et mer generelt trend-bilde å se på utbyttene plottet mot PSA/ $\log P$ .



**Figur 14** Utbytte mot PSA/ $\log P$  for 46 analytter. Et skille kan ses ved 40 % og ~60 % utbytte. Analyttene med utbytte  $< 40$  % har for det meste PSA/ $\log P$  på 0–5 og  $> 20$ . Analyttene med utbytte  $> \sim 60$  % har PSA/ $\log P$  på ~5–20

Utbyttet er plottet mot PSA/ $\log P$  i Figur 14 og viser en trend hvor analyttene med PSA/ $\log P$  mellom 0–5 og  $> 20$  har utbytte  $< 40$  %, og analyttene med PSA/ $\log P$  mellom ~5–20 har utbytte  $\geq \sim 60$  %. Av grafen fremkommer det også en trend hvor analyttene med utbytte ~60

% ligger innenfor et relativt bredt PSA/log P-intervall. Dette intervallet blir smalere og smalere for analyttene med høyere utbytter. Det kan ut fra dette se ut som det er et mønster der PSA/log P må ligge innenfor  $\sim 5\text{--}20$  for å kunne forvente utbytte  $> \sim 60\%$ , og for å kunne forvente utbytte  $\gg 60\%$ , må analyttene ligge innenfor PSA/log P  $\sim 10\text{--}15$ . Dette er i samsvar med PSA/log P-fordelingen av analyttene som oppfylte alle kriteriene, og viser at PSA/log P bør ligge innenfor et visst intervall for å oppnå tilfredsstillende ekstraksjoner.

Trendene vist i denne oppgaven underbygger derfor hypotesen om at det må være en viss likevekt mellom en analytts lipofile og hydrofile egenskaper for å kunne ekstraheres med PALME-NPBD.

Hypotesen om at analytter med PSA/log P mellom 9 og 14 er ideelle for PALME-NPBD er forbundet med usikkerhet av flere grunner: i) dette er et lite datasett som dekker et lite område av fysikalsk-kjemiske egenskaper, og det er derfor fare for ikke å se alle sammenhenger og trender; ii) det er ikke tatt høyde for konfunderende faktorer som kan gi et tilsynelatende forhold mellom PSA og log P; iii) sammenhengen kan gjelde for et lite datasett som dette, men ikke nødvendigvis et stort.

Siden mange analytter hadde utbytte under 40 %, ble fire analytter ekstrahert på nytt med DMSO i akseptorløsningen.

## 4.6 Preliminær test med DMSO i akseptorløsningen

Det er tidligere erfart at DMSO kan tilsettes til akseptorløsningen i PALME for å øke utbyttet under ekstraksjonen [41]. Tilsetting av DMSO i akseptorløsningen kan øke løseligheten til analyttene, og således fordelingen fra SLM til akseptorløsningen. En løsning på fire analytter (Gruppe IV) ble derfor ekstrahert ( $n=4$ ) med PALME-NPBD, men med tilsatt DMSO i akseptorløsningen i tre ulike konsentrasjoner; 10, 25 og 50 % (v/v). Analyttene som ble brukt var trisykliske analytter som i avsnitt 4.1 både ga utbytte  $> 40\%$  og utbytte  $< 40\%$ . De trisykliske analyttene som ga utbytte  $> 40\%$  ble tatt med i forsøket for å se om utbyttene til disse forandret seg ved tilsetting av DMSO.

For å finne ut hvilken DMSO-konsentrasjon som ga høyest utbytte, ble resultatene fra de tre konsentrasjonene sammenlignet med hverandre. Den DMSO-konsentrasjonen som ga høyest

## Resultater og diskusjon

utbytte ble deretter sammenlignet med resultatene for de samme analyttene fra resultatene som er presentert i avsnitt 4.

Utbyttene og RSD for de tre DMSO-konsentrasjonene er vist i Tabell 35.

**Tabell 35** Gjennomsnittlig utbytte i prosent for tre ulike DMSO-konsentrasjoner. % RSD i parentes

DMSO % (v/v)	Amitriptylin	Nortriptylin	Promazin	Trimipramin
10	68 % (6)	65 % (8)	66 % (7)	54 % (8)
25	68 % (10)	66 % (13)	68 % (11)	53 % (10)
50	68 % (10)	46 % (23)	67 % (10)	52 % (11)

Det var ingen stor forskjell mellom de ulike DMSO-konsentrasjonene og alle ga utbytter som var innenfor kravet. Alle hadde RSD innenfor kravet, bortsett fra nortriptylin ved 50 % (v/v) DMSO.

Ettersom høyere DMSO-konsentrasjoner ikke ga høyere utbytte, ble 10 % (v/v) DMSO brukt til sammenligningen under.

Sammenligningen mellom utbytte og RSD fra resultatene i avsnitt 4 (0 % DMSO) og resultatene fra 10 % (v/v) DMSO er vist i Tabell 36.

**Tabell 36** Sammenligning av utbyttene for fire analytter med 0 % DMSO og 10 % (v/v) DMSO

Analytt	Utbytte	Utbytte
	0 % DMSO	10 % (v/v) DMSO
Amitriptylin	39 % (10)	68 % (6)
Nortriptylin	54 % (11)	65 % (8)
Promazin	60 % (7)	66 % (7)
Trimipramin	35 % (12)	54 % (8)

For de fire analyttene som ble analysert, økte utbyttet da 10 % (v/v) DMSO ble tilsatt til akseptorløsningen. Analyttene som tidligere hadde et utbytte < 40 % hadde større økning enn analyttene som hadde utbytte > 40 %.

## 5 Konklusjon

Det ble i denne oppgaven vist at PALME-NPBD ekstraherte 8 av 46 legemidler og rusmidler med resultater som tilfredsstilte kravene som ble satt. Ingen av zwitterionene eller analyttene med  $\log P < 2$  var innenfor kravene, og dette var resultater som forventet ut fra  $\log P$ -verdien. Det var derimot ikke forventet at kun 8 av analyttene med  $\log P > 2$  var innenfor kravene, siden disse ble ansett som egnede kandidater for PALME-NPBD på grunn av  $\log P$ -verdiene.

For PALME-NPBD ble det funnet en sammenheng mellom PSA og  $\log P$  som viste at de fleste analyttene som var innenfor kravene hadde et PSA/ $\log P$ -forhold mellom 9 og 14. Ved både lavere og høyere forholdstall enn dette intervallet gikk antall analytter som tilfredsstilte kravene ned. Det ble i tillegg funnet en trend som viste at utbyttet var avhengig av PSA/ $\log P$ , hvor de fleste analyttene med utbytte  $> \sim 60\%$  hadde et PSA/ $\log P$ -forhold mellom  $\sim 5$  og 20. Videre arbeid kan gjøres for å undersøke om det er mulig å lage en modell til å forutsi analytters egnethet for PALME ut fra PSA/ $\log P$ -forholdet til analyttene.

Det ble vist at tilsetning av 10 % DMSO i akseptorløsningen i PALME-NPBD økte utbyttet for samtlige fire analytter som ble ekstrahert.

Ut fra erfaringene fra denne oppgaven vil det være naturlig å tilsette litt DMSO (eller tilsvarende løsemidler) i akseptorløsningen i forbindelse med PALME av upolare analytter. I tillegg vil det være naturlig å forsøke å lage generiske PALME-metoder basert på analyttenes PSA/ $\log P$ -forholdstall.

# Litteraturliste

1. Moein, M.M., A. El Beqqali, and M. Abdel-Rehim, *Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies*. Journal of Chromatography B, 2017. **1043**: p. 3-11.
2. Panuwet, P., et al., *Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring*. Critical reviews in analytical chemistry / CRC, 2016. **46**(2): p. 93-105.
3. Raynie, D.E., *Trends in sample preparation*. LC-GC Europe, 2016. **34**(3): p. 174-188.
4. Nováková, L. and H. Vlčková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 2009. **656**(1): p. 8-35.
5. Chiu, M.L., et al., *Matrix Effects—A Challenge toward Automation of Molecular Analysis*. JALA: Journal of the Association for Laboratory Automation, 2010. **15**(3): p. 233-242.
6. Ocana-Gonzalez, J.A., et al., *New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review*. Anal Chim Acta, 2016. **905**: p. 8-23.
7. Ask, K.S., et al., *Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction*. Anal Chim Acta, 2018. **1009**: p. 56-64.
8. Pilarova, V., et al., *One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017. **1043**: p. 25-32.
9. Ask, K.S., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016. **129**: p. 229-236.
10. Roldan-Pijuan, M., S. Pedersen-Bjergaard, and A. Gjelstad, *Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma*. Anal Bioanal Chem, 2015. **407**(10): p. 2811-9.
11. Vardal, L., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2017. **1048**: p. 77-84.
12. Olsen, K.N., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring*. Bioanalysis, 2018. **10**(6): p. 385-395.
13. Marta, K.Ł. and G. Anna, *A review of chromatographic methods for the determination of water- and fat-soluble vitamins in biological fluids*. Journal of Separation Science, 2016. **39**(1): p. 132-148.
14. Hiemke, C., et al., *Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: update 2017*. Pharmacopsychiatry, 2017.
15. Marin M. Jukić, et al., *Impact of CYP2C19 Genotype on Escitalopram Exposure and Therapeutic Failure: A Retrospective Study Based on 2,087 Patients*. American Journal of Psychiatry, 2018. **175**(5): p. 463-470.
16. SH, J., Y. Z., and L. JA, *Therapeutic drug monitoring: A patient management tool for precision medicine*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2016. **99**(2): p. 148-150.
17. Gjerde, H., E.L. Øiestad, and A.S. Christophersen, *Using biological samples in epidemiological research on drugs of abuse*. Norsk epidemiologi, 2011. **21**(1): p. 5-14.

18. Hansen, S.H., *Bioanalysis of pharmaceuticals : sample preparation, separation techniques, and mass spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, Wiley.
19. Wishart, D.S., et al., *HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(D1): p. D608-D617.
20. Manzone, T.A., et al., *Blood volume analysis: a new technique and new clinical interest reinvalidate a classic study*. Journal of nuclear medicine technology, 2007. **35**(2): p. 55-63.
21. Pedersen-Bjergaard, S. and E. Rasmussen Knut, *Legemiddelanalyse*. Vol. 2. 2010: Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS.
22. Lundanes, E., L. Reubsæet, and T. Greibrokk, *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. 2013: Wiley.
23. Ma, M. and F.F. Cantwell, *Solvent Microextraction with Simultaneous Back-Extraction for Sample Cleanup and Preconcentration: Quantitative Extraction*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(18): p. 3912-3919.
24. Jeannot, M.A. and F.F. Cantwell, *Solvent Microextraction into a Single Drop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2236-2240.
25. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
26. Gjelstad, A., et al., *Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode - Practical Considerations*. Lc Gc Europe, 2011. **24**(12): p. 633-+.
27. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. Analytica Chimica Acta, 2007. **592**(1): p. 1-8.
28. Gjelstad, A., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
29. Gjelstad, A., et al., *High-Throughput Liquid-Liquid Extraction in 96-Well Format: Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction*. Lc Gc Europe, 2017. **30**(1): p. 10-17.
30. Nazario, C.E., et al., *Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview*. J Chromatogr A, 2015. **1421**: p. 18-37.
31. Schwartz, J.C., M.W. Senko, and J.E.P. Syka, *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-669.
32. ChemAxon. [Lest 2018 30.04]; Tilgjengelig fra: <https://chemicalize.com/>.
33. Hagelin, G., *Buffere i Kjemi*. 1987: Universitetsforlaget AS. 80.
34. Smith, D.A., et al., *Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design*. 2012: Wiley.
35. Pajouhesh, H. and G.R. Lenz, *Medicinal chemical properties of successful central nervous system drugs*. NeuroRX, 2005. **2**(4): p. 541-553.
36. Clark, D.E., *Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. I. Prediction of intestinal absorption*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(8): p. 807-814.
37. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **23**(1): p. 3-25.
38. Billat, P.-A., et al., *Models for drug absorption from the small intestine: where are we and where are we going?* Drug Discovery Today, 2017. **22**(5): p. 761-775.
39. Egan, W.J., K.M. Merz, and J.J. Baldwin, *Prediction of Drug Absorption Using Multivariate Statistics*. Journal of Medicinal Chemistry, 2000. **43**(21): p. 3867-3877.

40. Avdeef, A., *The rise of PAMPA*. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2005. **1**(2): p. 325-342.
41. Wong, G., *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av basiske upolare substanser og benzodiazepiner*, in *Farmasøytisk Institutt*. 2017, University of Oslo. p. 109.



# Appendiks

## Appendiks 1 Gruppe III. Analytter og konsentrasjoner i stamløsningene

Analytt	Konsentrasjon
2C-E	3,61E-01 µmol/ml
3-fluorfenmetazin	1,00E-02 µmol/ml
6-APB	2,29E-01 µmol/ml
AH-7921	8,24E-02 µmol/ml
Alfa-PVP	2,73E-01 µmol/ml
Carfentanyl	1,27E-01 µmol/ml
Etylfenidat	1,17E-01 µmol/ml
Fentanyl	5,94E-02 µmol/ml
MDPV	1,61E-01 µmol/ml
Pentedron	4,98E-01 µmol/ml
9-OH-risperidon	5,00E+00 µM
Alimemazin	5,00E+00 µM
Amitriptylin	1,00E+01 µM
Baklofen	1,00E+02 µM
Citalopram	1,00E+01 µM
Doksepin	1,00E+01 µM
Duloksetin	5,00E+01 µM
Fluoksetin	1,00E+01 µM
Haloperidol	2,00E+00 µM
Hydroksybupropion	1,00E+01 µM
Hydroksyzin	2,00E+01 µM
Ketobemidon	5,00E+00 µM
Klometiazol	5,00E+02 µM
Klomipramin	1,00E+01 µM
Klorprotiksen	1,00E+01 µM
Klozapin	2,00E+01 µM
Levompropazin	1,00E+01 µM
Metoprolol	5,00E+01 µM
Mianserin	1,00E+01 µM
Nortriptylin	1,00E+01 µM
O-desmetyltramadol	2,00E+01 µM
Olanzapin	1,00E+01 µM
Paroksetin	1,00E+01 µM
Petidin	4,00E+01 µM
Prometazin	2,00E+01 µM
Propranolol	5,00E+01 µM
Kvetiapin	1,00E+01 µM
Sertralin	1,00E+01 µM
Trimipramin	1,00E+01 µM
Vareniklin	1,00E+01 µM
Venlafaksin	1,00E+01 µM

**Appendiks 2** Oversikt over konsentrasjonene til prøveløsningene - Gruppe III

∞	Etylfenidat	Carfentanyl	Alfa-PVP	AH-7921	6-APB	3- fluorfenmetazin	2C-E	Komponent
	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	Konsentrasjon
	1,17E-02	1,27E-02	2,73E-02	8,24E-03	2,29E-02	1,00E-03	3,61E-02	Nivå 1 (1/10)
	5,85E-03	6,35E-03	1,37E-02	4,12E-03	1,15E-02	5,00E-04	1,81E-02	Nivå 2 (1/20)
	2,93E-03	3,18E-03	6,83E-03	2,06E-03	5,73E-03	2,50E-04	9,03E-03	Nivå 3 (1/40)
	1,46E-03	1,59E-03	3,41E-03	1,03E-03	2,86E-03	1,25E-04	4,33E-03	Nivå 5 (1/83)
	1,17E-03	1,27E-03	2,73E-03	8,24E-04	2,29E-03	1,00E-04	3,47E-03	Nivå 6 (1/104)
	5,85E-04	6,35E-04	1,37E-03	4,12E-04	1,15E-03	5,00E-05	1,73E-03	Nivå 7 (1/208)
	2,93E-04	3,18E-04	6,83E-04	2,06E-04	5,73E-04	2,50E-05	8,66E-04	Nivå 8 (1/416)
	2,34E-04	2,54E-04	5,46E-04	1,65E-04	4,58E-04	2,00E-05	6,93E-04	Nivå 9 (1/526)
	1,95E-04	2,12E-04	4,55E-04	1,37E-04	3,82E-04	1,67E-05	5,54E-04	Nivå 10 (1/666)

Citalopram	Baklofen	Amitriptylin	Alimemazin	9-OH-risperidon	Pentetron	MDPV	Fentanyl
$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$	$\mu\text{mol/ml}$
1,00E+00	1,00E+01	1,00E+00	5,00E-01	5,00E-01	4,98E-02	1,61E-02	5,94E-03
5,00E-01	5,00E+00	5,00E-01	2,50E-01	2,50E-01	2,49E-02	8,05E-03	2,97E-03
2,50E-01	2,50E+00	2,50E-01	1,25E-01	1,25E-01	1,25E-02	4,03E-03	1,49E-03
1,25E-01	1,25E+00	1,25E-01	6,25E-02	6,25E-02	6,23E-03	2,01E-03	7,43E-04
1,00E-01	1,00E+00	1,00E-01	5,00E-02	5,00E-02	4,98E-03	1,61E-03	5,94E-04
5,00E-02	5,00E-01	5,00E-02	2,50E-02	2,50E-02	2,49E-03	8,05E-04	2,97E-04
2,50E-02	2,50E-01	2,50E-02	1,25E-02	1,25E-02	1,25E-03	4,03E-04	1,49E-04
2,00E-02	2,00E-01	2,00E-02	1,00E-02	1,00E-02	9,97E-04	3,22E-04	1,19E-04
1,67E-02	1,67E-01	1,67E-02	8,33E-03	8,33E-03	8,31E-04	2,68E-04	9,90E-05

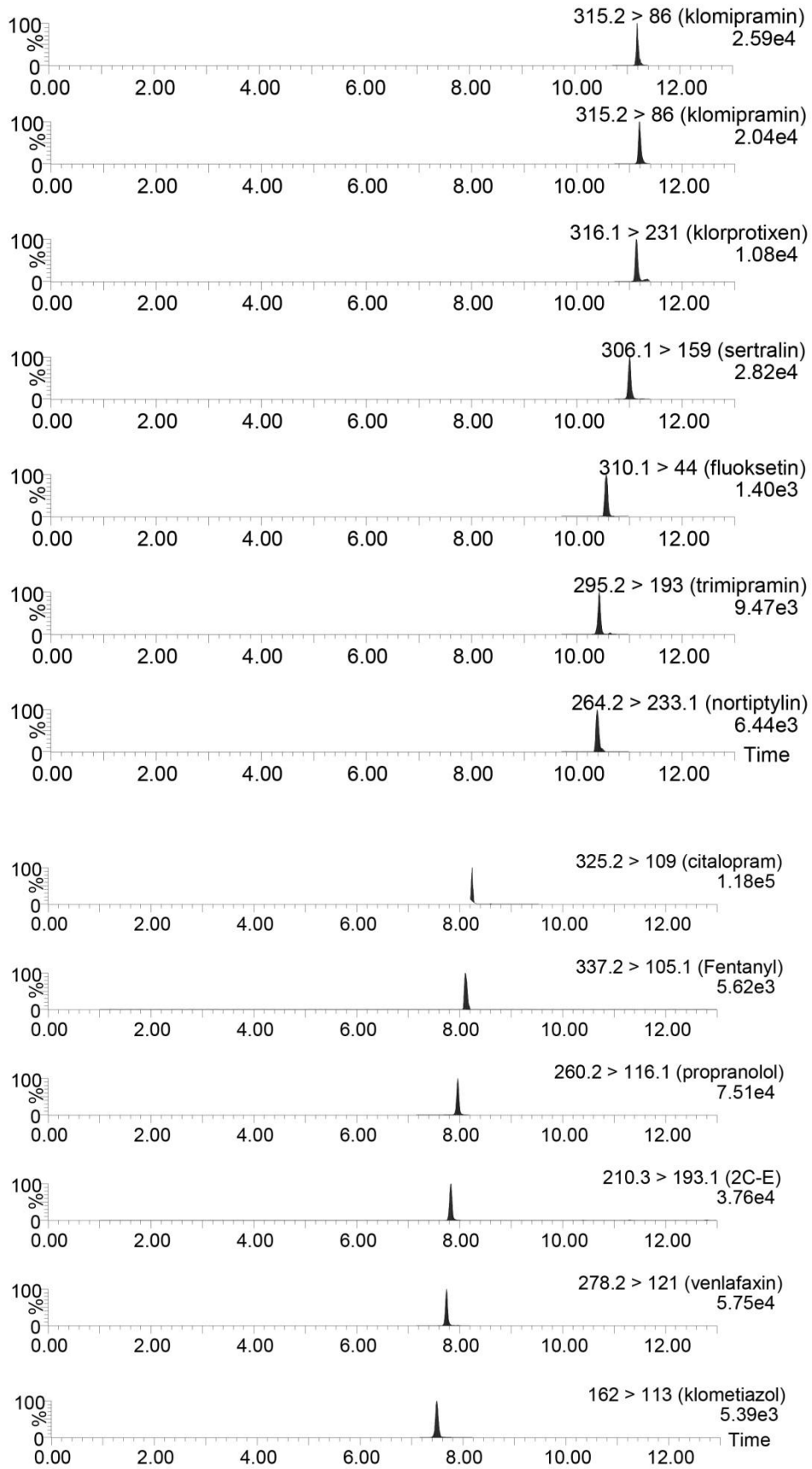
№	Klometiazol	Ketobemidon	Hydroksyzin	HydroksybupropiHaloperidol	Fluoksetin	Duloksetin	Doksepin
	µM	µM	µM	µM	µM	µM	µM
	5,00E+01	5,00E-01	2,00E+00	2,00E-01	1,00E+00	5,00E+00	1,00E+00
	2,50E+01	2,50E-01	1,00E+00	1,00E-01	5,00E-01	2,50E+00	5,00E-01
	1,25E+01	1,25E-01	5,00E-01	5,00E-02	2,50E-01	1,25E+00	2,50E-01
	6,25E+00	6,25E-02	2,50E-01	2,50E-02	1,25E-01	6,25E-01	1,25E-01
	5,00E+00	5,00E-02	2,00E-01	2,00E-02	1,00E-01	5,00E-01	1,00E-01
	2,50E+00	2,50E-02	1,00E-01	1,00E-02	5,00E-02	2,50E-01	5,00E-02
	1,25E+00	1,25E-02	5,00E-02	5,00E-03	2,50E-02	1,25E-01	2,50E-02
	1,00E+00	1,00E-02	4,00E-02	4,00E-03	2,00E-02	1,00E-01	2,00E-02
	8,33E-01	8,33E-03	3,33E-02	3,33E-03	1,67E-02	8,33E-02	1,67E-02

Nortriptylin	Mianserin	Metoprolol	Levompropazin	Klozapin	Klorprotiksen	Klomipramin
$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
1,00E+00	1,00E+00	5,00E+00	1,00E+00	2,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
5,00E-01	5,00E-01	2,50E+00	5,00E-01	1,00E+00	5,00E-01	5,00E-01
2,50E-01	2,50E-01	1,25E+00	2,50E-01	5,00E-01	2,50E-01	2,50E-01
1,25E-01	1,25E-01	6,25E-01	1,25E-01	2,50E-01	1,25E-01	1,25E-01
1,00E-01	1,00E-01	5,00E-01	1,00E-01	2,00E-01	1,00E-01	1,00E-01
5,00E-02	5,00E-02	2,50E-01	5,00E-02	1,00E-01	5,00E-02	5,00E-02
2,50E-02	2,50E-02	1,25E-01	2,50E-02	5,00E-02	2,50E-02	2,50E-02
2,00E-02	2,00E-02	1,00E-01	2,00E-02	4,00E-02	2,00E-02	2,00E-02
1,67E-02	1,67E-02	8,33E-02	1,67E-02	3,33E-02	1,67E-02	1,67E-02

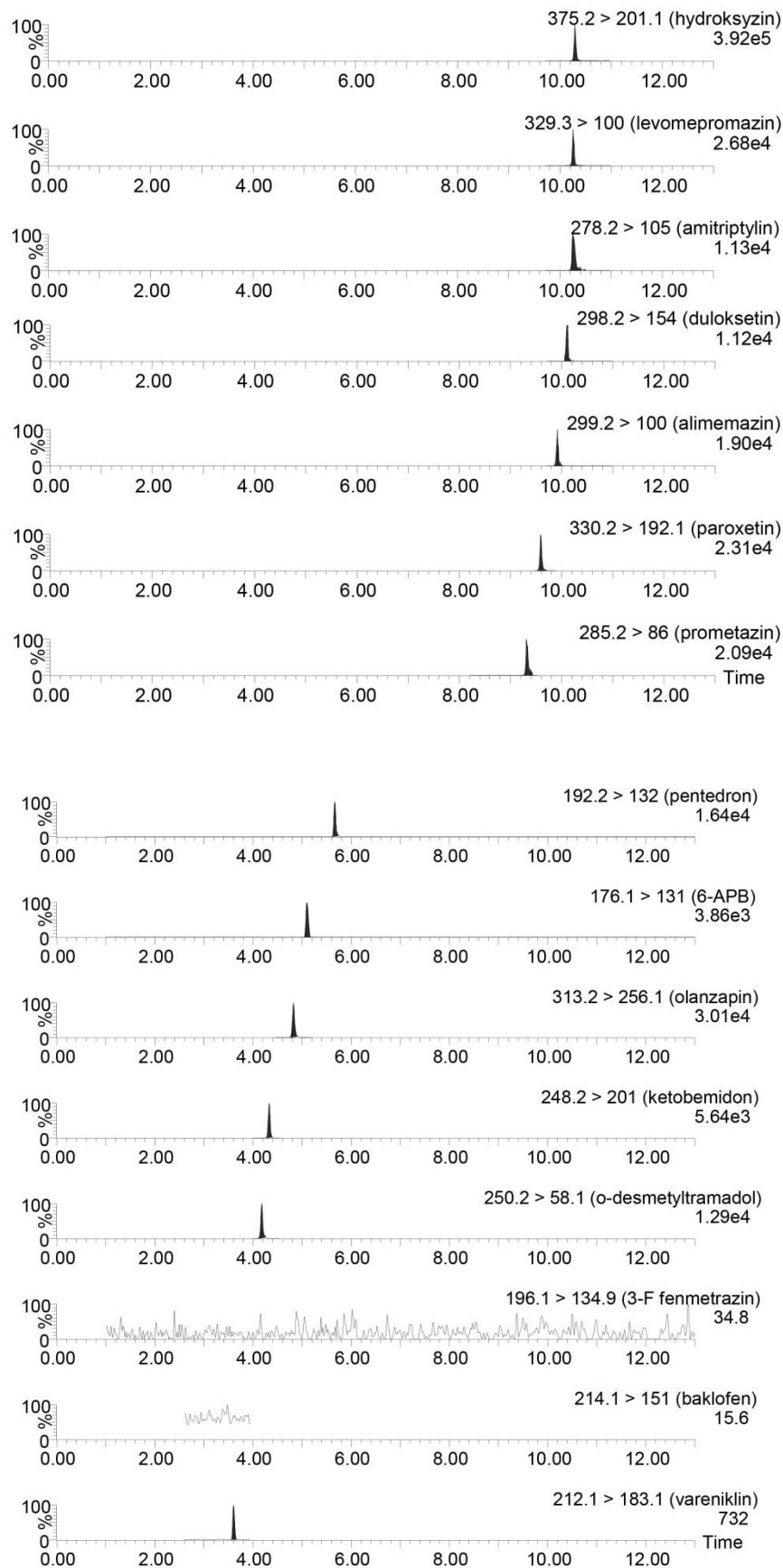
Kvetiapin	Propranolol	Prometazin	Petidin	Paroksetin	Olanzapin	O-desmetyltramadol
$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$	$\mu\text{M}$
1,00E+00	5,00E+00	2,00E+00	4,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	2,00E+00
5,00E-01	2,50E+00	1,00E+00	2,00E+00	5,00E-01	5,00E-01	1,00E+00
2,50E-01	1,25E+00	5,00E-01	1,00E+00	2,50E-01	2,50E-01	5,00E-01
1,25E-01	6,25E-01	2,50E-01	5,00E-01	1,25E-01	1,25E-01	2,50E-01
1,00E-01	5,00E-01	2,00E-01	4,00E-01	1,00E-01	1,00E-01	2,00E-01
5,00E-02	2,50E-01	1,00E-01	2,00E-01	5,00E-02	5,00E-02	1,00E-01
2,50E-02	1,25E-01	5,00E-02	1,00E-01	2,50E-02	2,50E-02	5,00E-02
2,00E-02	1,00E-01	4,00E-02	8,00E-02	2,00E-02	2,00E-02	4,00E-02
1,67E-02	8,33E-02	3,33E-02	6,67E-02	1,67E-02	1,67E-02	3,33E-02

Venlafaksin	Vareniklin	Trimipramin	Sertralin
μM	μM	μM	μM
1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
5,00E-01	5,00E-01	5,00E-01	5,00E-01
2,50E-01	2,50E-01	2,50E-01	2,50E-01
1,25E-01	1,25E-01	1,25E-01	1,25E-01
1,00E-01	1,00E-01	1,00E-01	1,00E-01
5,00E-02	5,00E-02	5,00E-02	5,00E-02
2,50E-02	2,50E-02	2,50E-02	2,50E-02
2,00E-02	2,00E-02	2,00E-02	2,00E-02
1,67E-02	1,67E-02	1,67E-02	1,67E-02

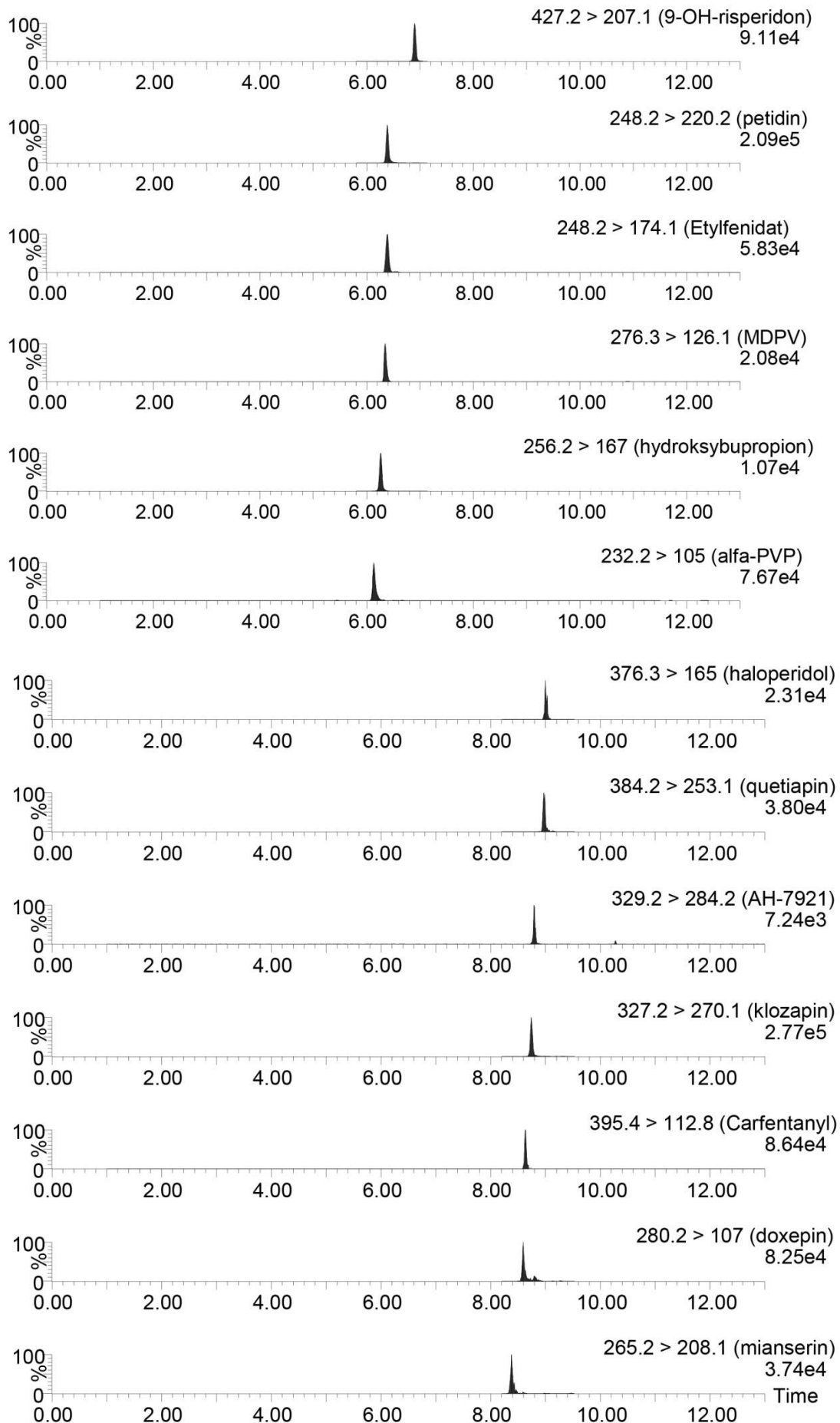
**Appendiks 3** Kromatogram for ekstraherte prøver ved konsentrasjonsnivå 10







*3-fluorfenmetrazin ble ikke ekstrahert ved denne parallellen.  
Baklofen ble ikke ekstrahert*



**Hensikt**

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en PALME-metode for ekstraksjon av vannløselige B-vitaminer fra plasma. B-vitaminene er en gruppe av både basiske og sure hydrofile stoffer, noe som kan være en utfordring å ekstrahere samtidig.

**Vitaminene**

Vitaminene som ble brukt i prosjektet var tiamin B<sub>1</sub>, riboflavin B<sub>2</sub>, nikotinsyre B<sub>3</sub>, pantotensyre B<sub>5</sub>, pyridoksin B<sub>6</sub>, biotin B<sub>7</sub>, cyanocobalamin B<sub>12</sub>. Log P- og pKa-verdier er vist i Tabell 37.

**Eksperimentelt**

Analysene ble utført på en Agilent 1200 HPLC fra Agilent (Santa Clara, CA, USA) med UV-DAD-detektor og Agilent ChemStation som programvare. Kolonnen som ble brukt var en C18 4,6 x 150 mm, 5 µm partikkelstørrelse ZORBAX Eclipse Plus fra Agilent (Santa Clara, CA, USA). Kolonnetemperatur var 35 °C og injeksjonsvolum var 5 µl. Gradienten og mobilfasesammensetningen er vist i Tabell 38. Til deteksjon ble bølgelengdene i Tabell 39 brukt.

**Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser fra vandige prøver**

Optimalisering av ekstraksjonsbetingelsene ble utført med forskjellige donorløsninger, SLM og akseptorløsninger. Oversikt over de ulike SLM som ble benyttet, med og uten tilsetninger, er vist i Tabell 40. Kombinasjoner av donorløsninger og akseptorløsninger som ble testet er vist i Tabell 41.

**Optimale betingelser for ekstraksjon fra vandige prøver**

De optimale PALME-betingelsene som ga høyest utbytte i vandige prøver er vist i Tabell 42.

## Konklusjon

Det ble i dette prosjektet vist at ekstraksjon av vannløselige B-vitaminer foreløpig gir utbytter < 40 % når de ekstraheres samtidig. Ettersom utbyttene fra de vandige prøvene var under kravet, ble det ikke forsøkt å ekstrahere fra plasma. En sannsynlig årsak til de lave utbyttene er at vitaminene er veldig hydrofile og en kombinasjon av både syrer og baser. Dette gjør at én metode sannsynligvis ikke gir optimale pH-betingelser for alle vitaminene, siden noen analytter kan være ladd under ekstraksjonen og således ha lav fordeling inn i SLM. Videre kunne det tenkes at en inndeling av vitaminene etter sure og basiske egenskaper og å utvikle to PALME-metoder ville gitt høyere utbytter.

## Appendiks

### Vitaminene

**Tabell 37** B-vitaminene og deres fysikalsk-kjemiske egenskaper

Analytt	log P	pKa
Tiamin B <sub>1</sub>	-3,10	5,54 (base)
Riboflavin B <sub>2</sub>	-0,92	5,97 (syre)
Nikotinsyre B <sub>3</sub>	-0,17	2,79 (syre); 4,19 (base)
Pantotensyre B <sub>5</sub>	-1,36	4,35 (syre)
Pyridoksin B <sub>6</sub>	-0,95	9,40 (syre); 5,58 (base)
Biotin B <sub>7</sub>	0,32	4,40 (syre)
Cyanocobalamin B <sub>12</sub>	-7,00	1,82 (syre); 13,44 (base)

Data er hentet fra ChemAxon tilgjengelig fra <https://chemicalize.com/>

### Eksperimentelt

**Tabell 38** Gradient og mobilfasesammensetning brukt til HPLC-analysen

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	99,0	1,0	1,0
1,50	88,0	12,0	1,0
1,53	70,0	30,0	1,0
7,00	70,0	30,0	1,0
8,00	0,0	100,0	1,0
12,00	0,0	100,0	1,0
12,10	99,0	1,0	1,0
Mobilfase A		Mobilfase B	
25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,5		Metanol	

**Tabell 39** Bølgelengdene brukt til deteksjon

Vitamin	Bølgelengde
Cyanocobalamin B <sub>12</sub>	360
Pyridoksin B <sub>6</sub>	290
Pantotensyre B <sub>5</sub>	210
Biotin B <sub>7</sub>	210
Riboflavin B <sub>2</sub>	270
Nikotinsyre B <sub>3</sub>	270
Tiamin B <sub>1</sub>	270
Biotin B <sub>7</sub>	220

### Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser fra vandige prøver

**Tabell 40** Oversikt over SLM som ble testet i vandige prøver

SLM
1-octanol
Aliquat 336
Diallyl ftalat
Heksylmetylketon
Bis(2-etylheksyl)fosfitt
Eugenol
Sykloheksanol
Tributylfosfitt
2,3,4,5,6-pentafluorbenzonitril
Tris(2-etylheksyl)fosfat
Etylacetat
1-heksyl-3-metyl-imidazolium Tris(pentafluoretyl)trifluorfosfat (Ion 2)
1-butyl-1 metylpyrrolidinium Bis(trifluormetylsulfonyl)imid (Ion 3)
Undekanon med 1 % TOA (w/w)
Undekanon med 15 % DEHP (w/w)
Undekanon med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Undekanon med 1 % TOA og 15 % DEHP:Aliquat 336 1:1 (w/w)
Undekanon med 15 % DEHP og 15 % aliquat 336 (w/w)
Isopentylbenzen med 1 % TOA (w/w)
Isopentylbenzen med 15 % DEHP (w/w)
Isopentylbenzen med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Dodecylacetat med 15 % DEHP (w/w)
Dodecylacetat med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Heksylmetylketon med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Sykloheksanol med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Sykloheksanol med 15 % Aliquat 336 (w/w)
Etylacetat med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Etylacetat med 15 % Aliquat 336 (w/w)
Tributylfosfitt med 1 % TOA og 15 % DEHP (w/w)
Tributylfosfitt med 15 % Aliquat 336 (w/w)

**Tabell 41** *Kombinasjoner av donorløsninger og akseptorløsninger som ble testet i vandige prøver*

Prøve løst i	Akseptorløsning
25 mM fosfatbuffer pH 2,5	Milliq-vann
Milliq-vann	Milliq-vann
Milliq-vann	DMSO
Milliq-vann	MilliQ-vann:DMSO 1:1 (v/v)
Milliq-vann	10 mM maursyre
Milliq-vann	10 mM NH <sub>3</sub>
25 mM fosfatbuffer pH 2,5	25 mM fosfatbuffer pH 2,5
25 mM fosfatbuffer pH 2,5	25 mM fosfatbuffer pH 7,0
25 mM fosfatbuffer pH 2,5	0,1 M karbonatbuffer pH 10,0
0,1 M karbonatbuffer pH 10,0	25 mM fosfatbuffer pH 2,5
25 mM fosfatbuffer pH 2,5 med 15 % isopropanol (v/v)	25 mM fosfatbuffer pH 7,0
MilliQ-vann med 15 % isopropanol (v/v)	25 mM fosfatbuffer pH 7,0

### Optimale betingelser for ekstraksjon fra vandige prøver

Ekstraksjonstiden var 45 minutter med en ristetthastighet på 900 rpm.

**Tabell 42** *Oversikt over betingelsene som ga høyest utbytte i vandige prøver*

Prøve løst i	SLM	Akseptorløsning
250 µl 25 mM fosfatbuffer pH 2,5	3 µl sykloheksanol	50 µl 25 mM fosfatbuffer pH 2,5
<b>Utbytte</b>		
Tiamin B <sub>1</sub>	26 %	
Riboflavin B <sub>2</sub>	10 %	
Nikotinsyre B <sub>3</sub>	30 %	
Pantotensyre B <sub>5</sub>	-	
Pyridoksin B <sub>6</sub>	18 %	
Biotin B <sub>7</sub>	-	
Cyanocobalamin B <sub>12</sub>	24 %	

- Ikke ekstrahert. Konsentrasjon i donorløsning: 2 µg/ml

**Hensikt**

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en PALME-metode for ekstraksjon av de fettløselige vitaminene A, D og E fra plasma. De fettløselige vitaminene er nøytrale og ekstraheres uten en pH-gradient.

**Vitaminer**

Vitaminene som ble brukt i dette prosjektet var retinol vitamin A, 25-hydroksykolekalsiferol vitamin D, alfa-tokoferol vitamin E. Log P- og pKa-verdier er vist i Tabell 43.

**Eksperimentelt**

Analysene ble utført på en Dionex Ultimate 3000 UHPLC fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA) med UV-deteksjon og Chromeleon som programvare. Kolonnen som ble brukt var en 2,1 x 100 mm, 1,8 µm partikkelstørrelse UPLC<sup>®</sup> HSS T3 fra Waters (Milford, MA, USA). Kolonnetemperatur var 50 °C og injeksjonsvolum 10 µl. Gradienten og mobilfasesammensetningen som ble brukt er vist i Tabell 44. Til deteksjon ble bølgelengdene i Tabell 45 brukt.

**Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser fra vandige prøver**

Optimalisering av ekstraksjonsbetingelsene ble utført med forskjellige donorløsninger, SLM og akseptorløsninger. Oversikt over de ulike SLM som ble benyttet er vist i Tabell 46. Kombinasjoner av donorløsninger og akseptorløsninger som ble testet er vist i Tabell 47.

**Ekstraksjon fra plasma**

Etter optimalisering fra vandige prøver, ble disse betingelsene tatt med videre for å gjøre PALME fra plasmaprøver. Det ble ekstrahert med og uten proteinfelling, som vist i Tabell 48.

**Optimale betingelser for ekstraksjon fra vandige prøver og plasmaprøver**

De optimale PALME-betingelsene som ga høyest utbytte i vandige prøver er vist i Tabell 49.

De optimale betingelsene til ekstraksjon fra plasma er vist i Tabell 50.

## Konklusjon

Det ble i dette prosjektet vist at PALME har potensiale til å ekstrahere de fettløselige vitaminene A og D fra både vandige prøver og plasmaprøver med utbytter > 40 %. Det ble likevel ikke gått videre med oppgaven siden utbyttene fra plasmaprøvene ikke kunne reproduseres fra dag til dag. Vitaminene er nøytrale og gjør at det er utfordrende å ekstrahere dem fordi det ikke kan etableres en pH-gradient til å drive ekstraksjonen. Vitamin E ble ikke ekstrahert, men oppgaven viser likevel at PALME kan ha et anvendelsesområde utenfor de tradisjonelle syre-base-ekstraksjonene. Årsaken til at vitamin E ikke ble ekstrahert kan være dens høye log P-verdi som gjør at fordelingen inn til SLM sannsynligvis er høy, mens fordelingen ut av SLM til akseptorløsningen er lav. Dette var også en utfordring for vitamin A og D, men utbyttene til disse økte ved å tilsette et organisk løsemiddel i akseptorløsningen. Andelen organisk løsemiddel kan dog ikke være for høy, siden dette kan løse opp SLM og svelle opp filtermembranen.

## Appendiks

### Vitaminene

**Tabell 43** Fettløselige vitaminer og deres fysikalsk-kjemiske egenskaper

Vitamin	log P	pKa
Retinol Vitamin A	4,69	Nøytral
25-Hydroksykolekalsiferol Vitamin D	5,65	Nøytral
Alfa-tokoferol Vitamin E	10,51	Nøytral

Data er hentet fra ChemAxon tilgjengelig fra <https://chemicalize.com/>

### Eksperimentelt

**Tabell 44** Gradient og mobilfasesammensetning brukt til UHPLC-analysen

Tid (min)	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	40,00	60,00	0,50
1,00	40,00	60,00	0,50
6,00	20,00	80,00	0,50
7,00	0,00	100,00	0,50
12,00	0,00	100,00	0,50
12,10	40,00	60,00	0,50
17,00	40,00	60,00	0,50
Mobilfase A		Mobilfase B	
MilliQ-vann		Acetonitril	



**Tabell 45** Bølgelengdene brukt til deteksjon

Vitamin	Bølgelengde
Vitamin A	295
Vitamin D	260
Vitamin E	295

### Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser for vandige prøver

**Tabell 46** Oversikt over SLM som ble testet i vandige prøver

SLM
Heksadekan
Silikonolje AR20
Silikonolje AS4
Undekanol
Undekanon
Heksadekan med 1 % TOA (w/w)

**Tabell 47** Kombinasjoner av donorløsninger og akseptorløsninger som ble testet i vandige prøver

Prøven løst i	Akseptorløsning
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Etanol
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Metanol
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Isopropanol
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	ACN:MilliQ-vann 60:40 (v/v)
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 1:1 (farge)
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Metanol:Isopropanol 9:1 (farge)
Etanol:MilliQ-vann 1:1 (v/v)	Dimetylformamid
MilliQ-vann	Metanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	DMSO:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	Etanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	1-propanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	2-propanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	ACN:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
MilliQ-vann	Metanol
MilliQ-vann	Metanol:MilliQ-vann 90:10 (v/v)
MilliQ-vann	Metanol:MilliQ-vann 85:15 (v/v)
MilliQ-vann	Metanol:MilliQ-vann 80:20 (v/v)
MilliQ-vann	Metanol:MilliQ-vann 70:30 (v/v)
MilliQ-vann	Natriumdodecylsulfat

## Optimalisering av ekstraksjonsbetingelser for plasma

**Tabell 48** Oversikt over kombinasjoner av donorløsninger og akseptorløsninger som ble testet i plasmaprøver

Prøven løst i	Akseptorløsning
MilliQ-vann:Plasma 1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25
MilliQ-vann:Plasma:ACN 100:112,5:37,5 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25
MilliQ-vann:Plasma: 6 % (w/v) perklorsyre 1:1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25
MilliQ-vann:Plasma: 10 % (w/v) perklorsyre 1:1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25
MilliQ-vann:Plasma: 5 % (w/v) perklorsyre 1:1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25
MilliQ-vann:Plasma: 2,5 % (w/v) perklorsyre 1:1:1 (v/v)	Metanol:MilliQ-vann 75:25

## Optimale betingelser for ekstraksjon fra vandige prøver og plasmaprøver

Ekstraksjonstid var 45 minutter med 900 rpm.

**Tabell 49** Oversikt over betingelsene som ga høyest utbytte i vandige prøver

Prøve løst i	SLM	Akseptorløsning
250 µl MilliQ-vann	5 µl heksadekan	100 µl metanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
<b>Utbytte</b>		
Vitamin A	55 %	
Vitamin D	82 %	
Vitamin E	-	

- ikke ekstrahert. Konsentrasjon i donorløsning: 1,0 µg/ml

**Tabell 50** Oversikt over betingelsene som ga høyest utbytte i plasmaprøver

Prøve løst i	SLM	Akseptorløsning
250 µl MilliQ-vann:Plasma: 6 % (w/v) perklorsyre 1:1:1 (v/v)	5 µl heksadekan	100 µl metanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)
<b>Utbytte</b>		
Vitamin A	44 %	
Vitamin D	44 %	
Vitamin E	-	

- ikke ekstrahert. Konsentrasjon i donorløsning: 0,033 µg/ml

## Appendiks 6 Poster presentert ved det 23. Norske Symposium i Kromatografi 2018<sup>1</sup>



# Parallell Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME) av vannløselige og fettløselige vitaminer

Håkon Hanssen Nestande, Marthe Lid, Stig Pedersen-Bjergaard  
Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

### Prinsipp

Parallell Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME) er et helt nytt konsept innen prøveoppbeholdelse<sup>(1)</sup>. Konseptet er kostnadseffektivt og miljøvennlig, og den eksperimentelle prosedyren er enkel. PALME er utformet i 96-brønns teknologi og kan derfor gjøre «high-throughput»-analyser.

Oppsettet består av en 96-brønns bunnplate og en 96-brønns filterplate korresponderende til bunnplaten. Platene klemmes sammen og ekstraksjonen foregår fra 200-250 mikroliter prøveløsning plassert i bunnplaten, gjennom en organisk væskemembran i filter (i filterplaten), og inn i 50-100 mikroliter vandig akseptorfase i filterplaten. Stegene er vist i Figur 1a-d.

### Eksperimentelt

**PALME**  
96-brønns bunnplate (0,5 ml) av polypropylen (Agilent)  
96-filterplate, 0,45 µm porestørrelse av polyvinylidenfluorid (Merck Millipore)  
Risting i 45 minutter med 900 rpm

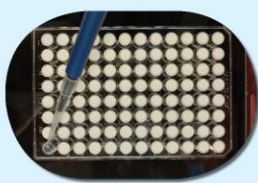
**Vannløselige vitaminer**  
Separasjon og deteksjon ble gjort på HPLC-UV  
Prøveløsning: 250 µl fosfatbuffer pH 2,5 tilsatt analytter  
Akseptorfase: 50 µl fosfatbuffer pH 7,0  
Organisk væskemembran: 3 µl sykloheksanol

**Fettløselige vitaminer**  
Separasjon og deteksjon ble gjort på UHPLC-UV  
Prøveløsning: 250 µl MilliQ-vann tilsatt analytter  
Akseptorfase: 100 µl metanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)  
Organisk væskemembran: 5 µl heksadekan

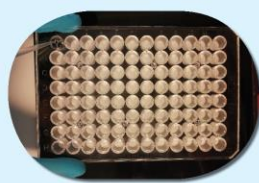
Formålet med prosjektet (masteroppgave) er å undersøke om PALME kan brukes til å ekstrahere vannløselige og fettløselige vitaminer



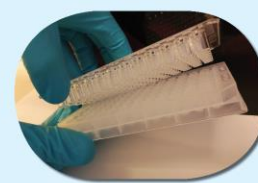
Figur 1a: Bunnplate. 250 µl prøveløsning tilsettes brønnene



Figur 1b: Filterplate. 3-5 µl organisk væske tilsettes filterene i filterplaten og danner en organisk væskemembran



Figur 1c: Filterplate. 50 µl akseptorfase tilsettes brønnene over de organiske væskemembranene



Figur 1d: Platene klemmes sammen og settes på risting i 45 minutter

### Foreløpige resultater

#### Vannløselige vitaminer

**Utfordringer**  
- Er vanskelige å ekstrahere inn i organisk væskemembran

**Løsning**  
- Optimalisering av organisk væskemembran

Optimal organisk væskemembran  
- Sykloheksanol

**Resultater**  
- Ekstraksjonsutbytte er vist i Figur 2  
- Ekstraksjonsutbyttene var lave (10-30 %) selv med optimalisert væskemembran

#### Fettløselige vitaminer

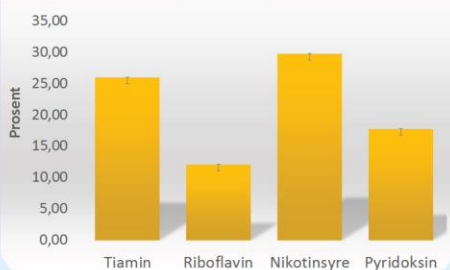
**Utfordringer**  
- Er vanskelige å ekstrahere fra organisk væskemembran til vandig akseptorfase  
- Organisk modifikator i akseptorfasen løser opp organisk væskemembran

**Løsning**  
- Tilsette organisk modifikator til akseptorfasen  
- Optimalisere akseptorfasen og bruke en veldig upolar organisk væskemembran

Optimal akseptorfase og væskemembran  
- Metanol:MilliQ-vann 75:25 (v/v)  
- Heksadekan

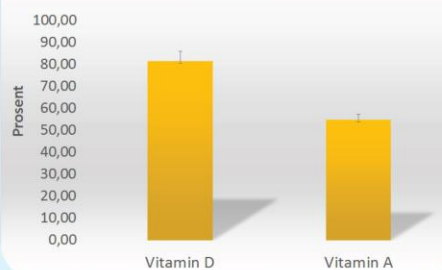
**Resultater**  
- Ekstraksjonsutbytte er vist i Figur 3  
- Ekstraksjonsutbyttene var på 50 - 80 % med optimalisert akseptorfase og væskemembran

#### Foreløpig utbytte for vannløselige vitaminer



Figur 2. Ekstraksjonsutbytte for vannløselige vitaminer

#### Foreløpig utbytte for fettløselige vitaminer



Figur 3. Ekstraksjonsutbytte for fettløselige vitaminer

### Konklusjon

PALME har potensial for ekstraksjon av fettløselige vitaminer

PALME av fettløselige vitaminer må gjøres fra plasma

PALME av vannløselige vitaminer har i dette prosjektet gitt lave ekstraksjonsutbytter

### Referanser

1 Gjelstad, A., et al., High-Throughput Liquid-Liquid Extraction in 96-Well Format: Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction. LC GC Europe, 2017, 30(1): p. 10-17.

<sup>1</sup>Vinner av posterpris for beste poster