

*Parallel artificial liquid membrane  
extraction (PALME) til analyse av  
basiske upolare substanser og  
benzodiazepiner*

Gladys Wong



Masteroppgave ved avdeling for farmasøytisk kjemi  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2017



# *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av basiske upolare substanser og benzodiazepiner*

Gladys Wong

Masteroppgaven ble gjennomført i perioden august 2016 – mai 2017 ved Faggruppe for Legemiddelanalyse, Avdeling Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitet i Oslo og Avdeling for rettsmedisinske fag, Klinikk for laboratoriemedisin, Oslo Universitetssykehus.

## **Veiledere**

### **Astrid Gjelstad**

Førsteamanuensis ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

### **Elisabeth Leere Øiestad**

Seniorforsker ved avdeling for rettsmedisinske fag, Oslo Universitetssykehus  
Førsteamanuensis II ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

### **Linda Vårdal**

Stipendiat ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

### **Stig Pedersen-Bjergaard**

Professor ved avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo

© Forfatter Gladys Wong

År 2017

Tittel «*Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)* til analyse av basiske upolare substanser og benzodiazepiner»

Forfatter

Gladys Wong

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

IV

# Sammendrag

*Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME), beskrevet første gang i 2013, representerer et nytt konsept for mikroekstraksjon. Det er et trefase-system med et ekstraksjonsprinsipp basert på væske-væske-ekstraksjon (*liquid-liquid-extraction*, LLE). Teknikken utføres i et 96-brønnsformat, med en organisk væskemembran immobilisert i et PVDF-filter mellom en donorplate og en akseptorplate. Analyttene ekstraheres fra vandige prøver i donorbrønnen, over den organiske væskemembranen, og til en akseptorløsning som er egnet for det utvalgte analyseinstrumentet. Fordeler som lavt løsemiddelforbruk, god opprensning og mulighet for automatisering gir potensial for utvikling av nye ekstraksjonsmetoder ved bruk av PALME for ulike stoffgrupper.

PALME har vært benyttet til analyse av en rekke legemidler med sure og basiske egenskaper, og ulike nye psykoaktive stoffer [1-3]. For å se om det var mulig å utvide med flere typer stoffer ble PALME av åtte basiske upolare rusgivende stoffer, samt elleve benzodiazepiner (og benzodiazepinlignende stoffer), undersøkt innledningsvis. Siden det viste seg at det optimaliserte PALME-systemet kunne være en god prøveopparbeidelsesmetode for benzodiazepiner ble det valgt å gå videre med denne stoffgruppen. Det ble testet 21 benzodiazepiner (og benzodiazepinlignende stoffer) i arbeidet. Følgende substanser ble inkludert: 7-aminoklonazepam, alprazolam, bromazepam, diazepam, deskloretizolam, diklazepam, etizolam, fenazepam, flubromazepam, flubromazolam, flunitrazepam, klonazepam, klonazolam, lorazepam, meklonazepam, midazolam, N-desmetyldiazepam, nitrazepam, oksazepam, zolpidem og zopiklon.

I de siste årene har det vært et økende misbruk av nye typer benzodiazepiner. Dette gir større behov for nye metoder som gir rask og nøyaktig bestemmelse av stoffene. Fokuset i oppgaven var å utvikle en effektiv metode for ekstraksjon av benzodiazepiner fra fullblod og som kunne benyttes til kvantitativ anvendelse. Flere ekstraksjonsparametere ble optimalisert i arbeidet. Det ble testet syv ulike organiske løsemidler som organisk væskemembran, ulike ekstraksjonstider, ulike pH-betingelser i prøveløsning, samt akseptorløsninger med ulike sammensetninger. Ekstraksjon med fullblod som analysemedium ble undersøkt, og prøveopparbeidelsesmetoden ble deretter delvis automatisert ved bruk av en 96-kanalpipette. En vesentlig forbedring av ekstraksjonsutbytte ble sett ved tilsetning av dimetylsulfoksid (DMSO) i akseptorløsningen, og bruk av 96-kanalpipette ga en kraftig reduksjon av analysetiden.

Den endelige prosedyren for ekstraksjon av benzodiazepiner ble utført ved å tilsette 100 µl fullblodprøve, 130 µl 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5 og 20 µl internstandard i donorbrønnen. Det ble benyttet organisk væskemembran bestående av 4 µl undekanon blandet med diheksyleter i forholdet 1:1 (w/w) med 1 % trioktylamin (w/w). I akseptorbrønnen ble 150 µl DMSO blandet med 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 (v/v) tilsatt. Platene ble satt sammen og topplaten ble forseglet. Oppsettet ble satt på risting i 60 minutter for å fremme ekstraksjonen. Analysen ble utført med *ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry* (UHPLC-MS/MS).

Den optimaliserte metoden for ekstraksjon av benzodiazepiner ble validert etter retningslinjene for bioanalytisk metodevalidering fra det europeiske legemiddelbyrået (*European Medicines Agency*, EMA). Resultatet viste at metoden ga ekstraksjonsutbytte mellom 52-104 %, og flere stoffer fikk tilnærmet 100 % utbytte. Matrikseffekter er innenfor 15 % og oppfylte kravet. Linearitet basert på gjennomsnittsverdier fra seks paralleller av hver standard ga kalibreringskurver med  $R^2$ -verdier på over 0,99 for alle stoffer. Linearitet beregnet for hver respons fra analyttene ga kalibreringskurver med noe lavere  $R^2$ -verdi, fem av stoffene fikk da  $R^2$ -verdier på over 0,98 og resten fikk  $R^2$ -verdier på over 0,99. Nøyaktighet og presisjon ble validert med laveste kontrollnivå mellom 3,2 og 160 ng/ml, avhengig av stoff, og høyeste kontrollnivå 19 ganger høyere. RSD-verdier oppfylte kravene for alle konsentrasjonsnivåer, mens to stoffer fikk et noe større avvik for innen serie-nøyaktigheten på ett kontrollnivå. Metoden hadde lave deteksjonsgrenser som er mellom 0,1-5 ng/ml og lave kvantifiseringsgrenser som er i området 3,2-160 ng/ml. Stabilitetstesten viste at ekstraktene var holdbare i opp til fire dager ved 10°C og opptil ti dager ved -20°C. Noe overdrag ble observert etter injeksjon av svært høye konsentrasjoner.

Det viste seg at PALME-metoden har ekstrahert benzodiazepiner (og benzodiazepinlignende stoffene) fra fullblod med tilfredsstillende resultater, og kan anvendes til både påvisning og kvantifisering av de undersøkte stoffene. Ekstraksjon av basiske upolare substanser fra vandige prøveløsninger har også vist gode resultater. PALME anses dermed å ha potensial for analyse av et større utvalg av stoffgrupper. Dette kan være av stor interesse innenfor det rettsmedisinske feltet.

# Forord

Først og fremst vil jeg rette en stor takk til mine veiledere for meget god veiledning, oppfølging og hjelp under arbeidet i masteroppgaven. Det har vært en hyggelig opplevelse å ha alle dere som veiledere.

Astrid Gjelstad, takk for at du har vist meg hvor interessant forskning er. Du er alltid tilgjengelig for spørsmål og du finner alltid på gode løsninger når noe ikke går som det skal. Du har motivert meg og gitt meg selvtillit i arbeidet, noe jeg setter stor pris på. Jeg er veldig glad for at jeg fikk deg som hovedveileder. Elisabeth Leere Øiestad, en stor takk til deg som har vært tilstede uansett om det er sent på kveld eller helg. Vi tenker så forskjellig og ikke like fort, men du har alltid forklart meg ting med stor tålmodighet. Det har vært ekstra koselig og inspirerende å jobbe med deg. Takk for god hjelp på lab, veiledning i oppgaveskriving, samtalene vi har hatt og mange andre ting. Takk Linda Vårdal for at du er så imøtekommende og at du stilte opp når jeg trengte hjelp på lab. Takk også for gode tips og oppmuntring jeg fikk under arbeidet av masteroppgaven. Takk til Stig Pedersen-Bjergaard for kloke og gode råd, det har vært til stor hjelp i arbeidet.

Takk Bassem, Patryk og Vyvy for at dere har gjort det ekstra gøy for meg å være på instituttet, og takk for all hjelp og oppmuntring jeg har fått av dere, studietiden hadde ikke vært den samme uten dere!

Takk til min kjære søster og mama som har backet meg opp og støttet meg på alle mulige måter. Jeg er utrolig takknemlig for å ha dere.





# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	1
<b>1 Innledning.....</b>	<b>4</b>
1.1 Bakgrunn.....	4
1.2 Hensikt.....	8
<b>2 Teori.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Prøveopparbeidelse .....</b>	<b>9</b>
2.1.1 Væske-væske-ekstraksjon.....	10
2.1.2 Væske-fase mikroekstraksjon .....	11
2.1.3 <i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i> .....	12
<b>2.2 Væskekromatografi .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Omvendt-fasekromatografi .....	14
2.2.2 <i>High performance liquid chromatography</i> .....	15
2.2.3 <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> .....	15
2.2.4 UV-detektor.....	17
2.2.5 Væskekromatografi-UV.....	17
2.2.6 Massespektrometri .....	17
2.2.7 Væskekromatografi-tandem massespektrometri .....	18
2.2.8 Elektrosprayionisasjon .....	18
2.2.9 Kvadrupolinstrumenter .....	19
<b>2.3 Rusmidler.....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Benzodiazepiner.....	21
2.3.2 Basiske upolare substanser.....	22
<b>3 Eksperimentelt.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Karakteristikk av analytter.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Utstyr .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 Kjemikalier .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Løsninger .....</b>	<b>28</b>
3.4.1 Stamløsninger.....	28
3.4.2 Arbeidsløsning.....	29
3.4.3 Standarder og kontroller.....	29
3.4.4 Internstandarder .....	31
3.4.5 Fullblod og plasma .....	32
3.4.6 Organisk væskemembran .....	32
<b>3.5 Instrumentelle betingelser.....</b>	<b>32</b>
3.5.1 UHPLC-UV-betingelser .....	33
3.5.2 UHPLC-MS/MS-betingelser .....	34
<b>3.6 Utførelse av PALME.....</b>	<b>36</b>

3.6.1	PALME fra vandige prøveløsninger .....	36
3.6.2	PALME fra fullblod .....	37
3.6.3	PALME fra fullblod ved bruk av 96-kanalpipette .....	37
<b>3.7</b>	<b>Innledende forsøk .....</b>	<b>38</b>
3.7.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere for basiske upolare substanser .....	38
3.7.2	Ekstraksjon av benzodiazepiner fra vandige prøveløsninger .....	39
<b>3.8</b>	<b>Optimalisering av ekstraksjonsparametere .....</b>	<b>40</b>
3.8.1	Akseptorløsning .....	40
3.8.2	Organisk væskemembran .....	41
3.8.3	Prøveløsning .....	41
3.8.4	Ekstraksjonstid .....	42
3.8.5	Automatisering .....	42
<b>3.9</b>	<b>Metodevalidering .....</b>	<b>42</b>
3.9.1	Linearitet .....	43
3.9.2	Nøyaktighet og presisjon .....	43
3.9.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon .....	43
3.9.4	Minste detekterbare konsentrasjon .....	43
3.9.5	Ekstraksjonsutbytte og matrikseffekter .....	44
3.9.6	Spesifisitet .....	44
3.9.7	Overdrag .....	44
3.9.8	Stabilitet .....	45
<b>3.10</b>	<b>Beregninger og formler .....</b>	<b>45</b>
3.10.1	Prosesseffektivitet .....	45
3.10.2	Nøyaktighet .....	45
3.10.3	Ekstraksjonsutbytte .....	45
3.10.4	Matrikseffekter .....	46
<b>4</b>	<b>Resultat og diskusjon .....</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Innledende forsøk .....</b>	<b>47</b>
4.1.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere for basiske upolare substanser .....	47
4.1.2	Ekstraksjon av benzodiazepiner fra vandige prøveløsninger .....	49
<b>4.2</b>	<b>Optimalisering av ekstraksjonsparametere .....</b>	<b>50</b>
4.2.1	Akseptorløsning .....	50
4.2.2	Organisk væskemembran .....	56
4.2.3	Prøveløsning .....	58
4.2.4	Ekstraksjonstid .....	61
4.2.5	Automatisering .....	63
<b>4.3</b>	<b>Metodevalidering .....</b>	<b>63</b>
4.3.1	Linearitet .....	63
4.3.2	Nøyaktighet og presisjon .....	65
4.3.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon .....	70
4.3.4	Minste detekterbare konsentrasjon .....	70

4.3.5	Ekstraksjonsutbytte.....	70
4.3.6	Matrikseffekter.....	72
4.3.7	Spesifisitet .....	73
4.3.8	Overdrag.....	74
4.3.9	Stabilitet .....	75
<b>5</b>	<b>Konklusjon .....</b>	<b>78</b>
	<b>Litteraturliste .....</b>	<b>80</b>
	<b>Vedlegg .....</b>	<b>84</b>

# Forkortelser

µg	mikrogram
µl	mikroliter
µm	mikrometer
7-AK	7-aminoklonazepam
ACN	acetonitril
Alfa-PVP	alfa-pyrrolidinopentiofenon
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionization</i> / atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon
APPI	<i>atmospheric pressure photoionization</i> / atmosfæretrykk-fotoionisasjon
CE	<i>capillary electrophoresis</i> / kapillær elektroforese
DEHPI	Bis(2-etylheksyl)fosfit
DLLME	<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DMSO	dimetylsulfoksid
DMT	N,N-dimetyltryptamin
EMA	<i>European Medicines Agency</i> / det europeiske legemiddelbyrå
ESI	<i>electrospray ionization</i> / elektrosprayionisasjon
EtOH	etanol
GC	<i>gas chromatography</i> / gasskromatografi
GC-MS	<i>gas chromatography mass spectrometry</i> / gasskromatografi koblet til massespektrometri
HCOOH	maursyre
HETP	høydeekvivalenten til en teoretisk plate
HF-LPME	<i>hollow-fiber liquid-phase microextraction</i> / hulfiber væskefase-mikroekstraksjon

PLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
kV	kilovolt
LC-MS	<i>liquid chromatography mass spectrometry</i> / væskekromatografi koblet til massespektrometri
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> / væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri
LLE	<i>liquid-liquid-extraction</i> / væske-væske-ekstraksjon
LOD	<i>limit of detection</i> / deteksjonsgrense
LOQ	<i>limit of quantification</i> / kvantifiseringsgrense
LPME	<i>liquid-phase microextraction</i> / væskefase-mikroekstraksjon
MDPV	metylendioksyprovaleron
ME	matrikseffekt
MeOH	metanol
min	minutt
ml	milliliter
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	massespektrometri
MS/MS	tandem massespektrometri
m/z	<i>mass-to-charge ratio</i> / masse-til-ladningsforhold
n	antall replikater
NaOH	natriumhydroksid
OUS	Oslo Universitetssykehus
PALME	<i>parallel artificial liquid membrane extraction</i> / parallell-kunstig-væskemembran-ekstraksjon
PE	prosesseffektivitet

PP	<i>protein precipitation</i> / proteinfelling
PVDF	polyvinyldenfluorid
R <sup>2</sup>	korrelasjonskoeffisient
RE	<i>recovery</i> / ekstraksjonsutbytte
RSD	<i>relative standard deviation</i> / relativt standardavvik
rpm	<i>revolutions per minute</i> / omdreininger per minutt
SDME	<i>single-drop microextraction</i>
SIM	<i>selected ion monitoring</i>
SLE	<i>supported liquid-liquid extraction</i>
SLM	<i>supported liquid membrane</i> / organisk væskemembran
S/N	<i>signal-to-noise-ratio</i> / signal-til-støy-forhold
SPE	<i>solid-phase extraction</i> / fast-fase-ekstraksjon
TOF	<i>time-of-flight</i>
UHPLC	<i>ultra-high pressure liquid chromatography</i>
v/v	<i>volume to volume ratio</i> / blandingsforhold i volum
w/w	<i>weight to weight ratio</i> / blandingsforhold i vekt

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Analyse av legemidler og lignende substanser i biologiske matrikser som urin, plasma, blod og spytt betegnes som bioanalyse [4]. Bioanalyse anvendes i legemiddelutvikling i farmasøytisk industri, terapeutisk legemiddelmonitorering på sykehuslaboratoriet, dopingkontroll og analyse av stoffer med misbrukspotensial på rettsmedisinske laboratorier [4]. Slike analyser kan være utfordrende ettersom analytter ofte foreligger i lave konsentrasjoner. Det kreves følsomme analyseinstrumenter for kvalitative eller kvantitative bestemmelser. I tillegg inneholder biologiske matrikser endogene komponenter og andre stoffer som kan påvirke signalet fra analytter, og medføre upålitelige resultater. På bakgrunn av ovennevnte er man i bioanalyse ofte avhengig av prøveopparbeidelse for å isolere analytter fra forurensninger i prøvene [4]. Prøveopparbeidelse muliggjør også oppkonsentrering, slik at analytter med svært lave konsentrasjoner i prøver likevel kan detekteres.

Væskrokromatografi koblet til tandem massespektrometri (*liquid chromatography tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) er en analyseteknikk som ofte benyttes i moderne laboratorier [5]. På grunn av sin følsomhet, selektivitet og hastighet har anvendelsen av teknikken blitt foretrukket ved analyse av lavmolekylære medikamenter og metabolitter i biologiske matrikser [5, 6]. LC-MS/MS er spesielt utsatt for matrikseffekter [6]. Mekanismen bak fenomenet er ikke fullt ut kjent, men det kan komme av konkurranse mellom analytt og koeluerende substans om ionisering i ionekilden. Dette undertrykker eller forsterker signalintensiteten til ionene tilhørende analytten, som igjen fører til unøyaktig bestemmelse av analyttkonsentrasjonen [7]. Endogene komponenter kan i tillegg detekteres og gi falske positive resultater. En prøveopparbeidelse som gir god opprensning og eliminerer matrikseffekter er dermed essensielt ved bruk av LC-MS/MS. Ettersom prøveopparbeidelsen kan ta opptil 80 % av total analysetid, og ikke minst bruker mye operatørtid, er effektivisering også et fokus i utvikling av prøveopparbeidelsesmetoder [8].

Vanlige prøveopparbeidelsesmetoder for biologiske matrikser omfatter væske-væske-ekstraksjon (*liquid-liquid-extraction*, LLE), fast-fase-ekstraksjon (*solid-phase extraction*, SPE) og proteinfelling (*protein precipitation*, PP) [6]. PP er den raskeste og enkleste metoden. På grunn av enkelhet og mulighet for automatisering ved bruk av dedikerte 96-brønnsplater, er

teknikken benyttet i stor grad i moderne farmasøytiske laboratorier [9, 10]. Noen ulemper med PP er at den kan være lite kostnadseffektiv, og at den ikke nødvendigvis gir effektiv opprensning. LC-MS/MS-analyse kan følgelig være utsatt for signalsuppresjon for ionene [11]. I forhold til PP, har både LLE og SPE vist å kunne gi god ekstraksjonseffektivitet og mindre matrikseffekter [12]. Likevel er LLE problematisk å automatisere, og metoden kan kreve ekstraksjon i flere trinn for å oppnå renere ekstrakt. Dette fører til høyt forbruk av organiske løsemidler [10]. Når analytter er ekstrahert til en organisk fase og skal reløses i en vandig løsning som er kompatibel med LC-MS/MS er inndamping av organisk løsemiddel i tillegg tids- og arbeidskrevende [6]. I motsetning til LLE er SPE lett å automatisere, men i likhet med LLE krever metoden store mengder av organiske løsemidler og er relativt kostbar [6].

I de siste årene har væske-fase mikroekstraksjon (*liquid phase microextraction*, LPME) blitt utviklet basert på LLE. Den nye miniaturiserte teknologien har bidratt til redusert forbruk av organiske løsemidler, og benyttes i *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME), *single-drop microextraction* (SDME) og *hollow-fiber liquid-phase microextraction* (HF-LPME) [11]. Et tre-fasesystem er anvendt i blant annet HF-LPME, hvor analytter ekstraheres fra en vandig prøve til noen mikroliter av organisk løsemiddel, og løser seg videre i en akseptorløsning som er egnet for LC-MS/MS-instrumentet. På den måten er inndamping av løsemiddel ikke lenger nødvendig. Ved å endre ekstraksjonsparametere som organisk væskemembran, pH i akseptorløsning og prøveløsning, kan ekstraksjonssystemet tilpasses analytter med ulike egenskaper [13]. Teknikkene gir flere fordeler som rene ekstrakter, fleksibilitet og kompatibilitet. Likevel er det vanskelig å innføre multibrønnsformatet i systemet for å øke effektivitet [6].

I 2013 ble *parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) publisert av Gjelstad, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen [6]. Den nye metoden er en modifisert utgave av HF-LPME. Mens HF-LPME har en organisk væskemembran immobilisert i porene av en hulfiber, er den organiske væskemembranen i PALME inkorporert i PVDF-filtre mellom en donorplate og en akseptorplate i et 96-bønnsformat. Sammen med prøveløsning og akseptorløsning dannes det et tre-fasesystem hvor kun noen få mikroliter av organisk løsemiddel er påkrevd. Ekstraksjonen foregår som passiv diffusjon. Analytter blir ekstrahert fra en donorbrønn, over en organisk væskemembran og til en vandig akseptorløsning som kan injiseres direkte i LC/MS-MS-instrumentet. Ved ekstraksjon av analytter til et lavt volum av akseptorløsning gis det mulighet



for oppkonsentrering av analytter, og 96-brønnsformatet i PALME gir i tillegg anledning til ekstraksjon av 96 prøver samtidig, samt automatisering.

I oppgaven ble PALME benyttet for første gang til ekstraksjon av benzodiazepiner med fullblod som analysemedium. Benzodiazepiner er vanedannende legemidler som har et misbrukspotensial [14]. Substansene er de mest detekterte stoffene ved kontroll av kjøring under påvirkning av andre rusmidler enn alkohol i Norge [15]. I de senere år har også illegale benzodiazepiner i økende grad blitt solgt for rekreasjonsbruk via internett [14]. Benzodiazepiner har sederende, angstdempende, beroligende, muskelrelakserende og krampestillende effekt [16]. Til tross for at stoffene er relativt trygge å bruke, kan misbruk av benzodiazepiner gi økt risiko for helseskade, spesielt i kombinasjon med alkohol og andre psykoaktive stoffer som også virker dempende på sentralnervesystemet [17, 18]. Dette kan forårsake alvorlig respiratorisk depresjon og dødsfall [19]. Misbruk av benzodiazepiner er i tillegg involvert i selvmord, trafikkulykker og seksuelle overgrep, noe som gjør at de er blant de hyppigst forekommende substansene i det rettsmedisinske feltet [20, 21].

Benzodiazepiner kan analyseres i ulike biologiske matrikser som fullblod, urin, plasma og spytt [22]. Ved kontroll av kjøring under påvirkning anses blod som den foretrukne biologiske matriksen [23]. Årsaken til dette er at måling i blod kan relateres til nylig bruk og påvirkning fra stoffer. Fullblod er det vanligste mediet for rettstoksikologiske analyser, da bruk av gelrør kan påvirke den målte konsentrasjonen av legemidler, og prøvene oftest må sendes i posten slik at umiddelbar sentrifugering ikke er aktuelt [24].

I klinisk- og rettstoksikologi er hurtigtester mye brukt for påvisning av benzodiazepiner [21]. Det bygger på immunologiske prinsipper i form av antigen-antistoff-reaksjoner på spesialpreparerte teststrimler [25]. Immunologiske metoder har fordeler som rask analyse og fleksibilitet, men kan gi både falske positive og negative resultater [21]. En bekreftende analyse med kromatografi er dermed essensielt for å unngå feil påvisning av substansene.

Det har blant annet vært vanlig med analyse av benzodiazepiner ved hjelp av gasskromatografi koblet til massespektrometri (GC-MS), men mange av benzodiazepinene krevde derivatisering ved analyse [18, 26]. I løpet av de siste årene har væskechromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC/MS-MS) blitt en etablert analyseteknikk til både påvisning og

kvantifisering av benzodiazepiner i ulike biologiske matrikser [18, 26, 27]. Det kreves enklere prøveopparbeidelse og kortere analysetid.

I toksikologiske laboratorier er det vanlig at et stort antall prøver skal bestemmes i løpet av kort tid, noe som gjør det nødvendig å kunne benytte en metode som gir effektiv analyse. Flere prøveopparbeidelsesmetoder som SPE, LLE og *supported liquid-liquid extraction* (SLE) har blitt overført til et 96-brønnsformat for å oppnå raskere analyse av benzodiazepiner og automatisering [28-30]. Disse teknikkene er kommersielt tilgjengelige, men er ofte kostbare, og krever inndampingsstrinnet som medfører lengre operatørtid. I tillegg er det høyt forbruk av organiske løsemidler i metodene i forhold til PALME.

Innenfor LPME har HF-LPME med et tre-fasesystem også vært i bruk til bestemmelse av flere benzodiazepiner, og DLLME ble benyttet med et to-fasesystem. DLLME-metoden ga generelt lavt utbytte og en høy grad av ionsuppresjon [31]. HF-LPME har vist å kunne ekstrahere benzodiazepiner med høyt utbytte. Denne analysen ble utført med GC-MS, noe som krevde derivatisering [32]. Det er ikke tidligere publisert noen studie innenfor LPME som har benyttet DMSO i akseptorløsning.

En annen utfordring er en økende forekomst av såkalte «designerbenzodiazepiner». Substansene representerer nye benzodiazepiner som har blitt misbrukt for rekreasjonsformål og selges stort sett via internett [14]. I dag er det over 50 forskjellige benzodiazepiner og benzodiazepinlignende stoffer som er tilgjengelige på det illegale markedet [33]. Det er derfor viktig å kunne endre repertoaret jevnlig. Enkelte designerbenzodiazepiner er metabolitter av forskrevne legemidler eller kan metaboliseres i kroppen til substanser som også er metabolitter av lovlige benzodiazepiner [34]. Dette kan gi feil tolking av analyseresultatet ved for eksempel deteksjon av kun metabolitter, og en analysemetode i blod som også kan måle moderstoffet er derfor fordelaktig.

Som konklusjon er det behov for utvikling av en miljøvennlig og kostnadseffektiv metode med stor screeningskapasitet, og som gir effektiv ekstraksjon av benzodiazepiner fra fullblod.

## 1.2 Hensikt

I denne oppgaven ble PALME utforsket for et større utvalg av rusgivende stoffer. Analyttene som ble benyttet i forbindelse med oppgaven inkluderer alfa-PVP, DMT, etylfenidat, ketamin, kokain, MDPV, metadon, metamfetamin, 7-aminoklonazepam, alprazolam, bromazepam, diazepam, deskloretizolam, diklazepam, etizolam, fenazepam, flubromazepam, flubromazolam, flunitrazepam, klonazepam, klonazolam, lorazepam, meklonazepam, midazolam, N-desmetyldiazepam, nitrazepam, oksazepam, zolpidem og zopiklon.

Punktvis fremstilling av hensikten med oppgaven:

- Utprøving av PALME for et større utvalg rusgivende stoffer
- Optimalisering av ekstraksjonsparametere
- Ekstraksjon av benzodiazepiner fra fullblod
- Analyse av ekstraktene ved bruk av UHPLC-MS/MS
- Validering av metoden
- Vurdering av metoden for analyse av benzodiazepiner

## 2 Teori

### 2.1 Prøveopparbeidelse

I denne oppgaven er fokuset rettet mot prøveopparbeidelse av benzodiazepiner fra fullblod for å oppnå sikker påvisning og kvantifisering ved bruk av LC-MS/MS.

Fullblod er et komplekst medium i bioanalyse som består av erytrocytter, leukocytter, trombocytter og andre celler som ligger i en matriks kalt plasma [35]. Fullblod har en pH på omtrent 7,4, med god bufferkapasitet [36]. Flere matrikskomponenter som er til stede i biologiske matrikser kan forstyrre responsen fra analytter ved analyse og gi interferens i analyseinstrumentet. Fenomenet betegnes generelt som matrikseffekter. Matrikseffekter kan føre til unøyaktig bestemmelse og kvantifisering, det er derfor en viktig parameter som bør undersøkes ved utvikling og validering av analysemetoder [35].

LC-MS/MS har som nevnt blitt benyttet til kvantitativ og kvalitativ bestemmelse av benzodiazepiner i fullblod på grunn av sin spesifisitet og følsomhet [5, 20]. Teknikken er imidlertid spesielt utsatt for matrikseffekter [6]. Ved analyse av fullblodprøver har endogene fosfolipider blitt identifisert som en hovedkilde til matrikseffekter i LC-MS/MS-analyse [37]. I tillegg til matrikseffekter kan matrikskomponentene kontaminere og ødelegge analyseinstrumentet [36]. Ved analyse av fullblodprøver kreves derfor prøveopparbeidelse for å eliminere matrikskomponentene og gjøre prøvene kompatible med analyseinstrumentet. Dette for å oppnå et pålitelig og nøyaktig resultat. En annen fordel ved prøveopparbeidelse er muligheten for oppkonsentrering ved å isolere analytter i en ren løsning som har mye lavere volum enn prøveløsningen, slik at analytter som foreligger i lave konsentrasjoner likevel kan detekteres.

De klassiske og mest anvendte metodene i prøveopparbeidelse er LLE, SPE og PP [38]. Som nevnt ovenfor er disse metodene ikke nødvendigvis tilfredsstillende for det moderne laboratoriet. Metodene har flere begrensninger i forbindelse med løsemiddelforbruk, matrikseffekter, automatisering og effektivitet. Dette har resultert i økende behov for utvikling av nye prøveopparbeidelsesmetoder som er mer miljøvennlige, kostnadseffektive og som gir god opprensning

### 2.1.1 Væske-væske-ekstraksjon

LLE står sentralt i utviklingen av moderne bioanalytiske metoder. Ekstraksjonssystemet er et tofase-system bestående av to ikke-blandbare væsker: et vandig løsemiddel og et organisk løsemiddel. Ekstraksjonen er fremmet av løselighetsforskjeller, slik at analytter isoleres fra en prøveløsning og løser seg i en ikke-blandbar væske (akseptorløsning), mens forurensninger forblir i den opprinnelige fasen. Ekstraksjon av en analytt er illustrert med **Ligning 1**.

**Ligning 1** [39]: 
$$A_{[vandig\ prøveløsning]} \rightleftharpoons A_{[organisk\ løsemiddel]}$$

Under ekstraksjonen fordeles analytten i en organisk fase og en vandig fase. Fordelingen uttrykkes ved fordelingskoeffisienten  $K_d$ , og er beskrevet med **Ligning 2**.

**Ligning 2** [38]: 
$$K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

De fleste legemidler har sure eller basiske egenskaper som gjør at de kan være i dissosiert og udissosiert form i vandige løsninger [40]. Fordelingen av analyttene kan følgelig påvirkes av sine respektive  $pK_a$ -verdier, samt pH i vannfasen. Fordelingen uttrykkes ved fordelingsforholdet  $D$ . For en basisk analytt er fordelingen beskrevet med **Ligning 3**.

**Ligning 3** [38]: 
$$D = \frac{c_{org}}{c_{aq}} = \frac{[HA]_{org}}{[A]_{aq} + [AH]_{aq}^+}$$

Ligningen viser at fordelingen av analytten kan endres ved å justere pH i vannfasen, slik at analytter får bedre løselighet i akseptorløsningen og dermed økt ekstraksjonsutbytte. Ved pH som er to enheter under eller over analyttens  $pK_a$ -verdi oppnås fullstendig protonert form eller nøytral form av analytten [38]. LLE gir god opprensning, men har som nevnt noen negative sider [5]. Det er høyt forbruk av løsemidler, og ekstraksjonsmetoden krever ofte inndamping av organisk løsemiddel. I tillegg er automatisering også en utfordring ved bruk av LLE.

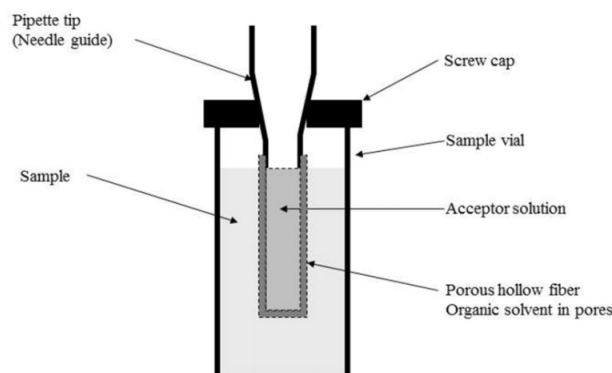
### 2.1.2 Væske-fase mikroekstraksjon

LPME ble utviklet og introdusert for å oppnå bedre effektivitet med en enkel og rimelig metode basert på LLE. Kun noen mikroliter løsemiddel er nødvendig for å oppkonsentrere analytter fra en prøve. LPME kan deles inn i tre hovedtyper som består av SDME, HF-LPME, og DLLME [41].

I HF-LPME blir analytter ekstrahert fra en prøveløsning til en akseptorløsning ved passiv diffusjon gjennom en organisk væskemembran som kalles *supported liquid membrane* (SLM). Den organiske væskemembranen dannes ved å dyppe hulfiberen i et organisk løsemiddel, slik at løsemiddelet immobiliseres i porene til hulfiberen ved hjelp av kapillærkrefter. I lumen av hulfiberen fylles akseptorløsning, og hulfiberen plasseres deretter i prøveløsningen [41]. Oppsettet for HF-LPME er vist i **Figur 1**. Avhengig av om akseptorløsningen er organisk eller vandig, dannes det enten et tofase- eller trefase-system. Med tofase-systemet er ekstraksjon av analytt illustrert med **Ligning 1** i avsnitt 2.1.1. Med trefase-systemet er diffusjonen av analytt illustrert med **Ligning 4**.

**Ligning 4** [39]:  $A_{[prøveløsning]} \rightleftharpoons A_{[organisk\ væskemembran]} \rightleftharpoons A_{[vandig\ akseptorløsning]}$

Ekstraksjonen utføres ved at hele oppsettet ristes for å fremme diffusjon av analytter. Ekstrakter tas ut av hulfiberen etter ekstraksjonen og analyseres ved bruk av analyseteknikk som HPLC, GC og kapillær elektroforese (CE) [42].



**Figur 1: Ekstraksjonsenhet til HF-LPME, hentet fra [42].**

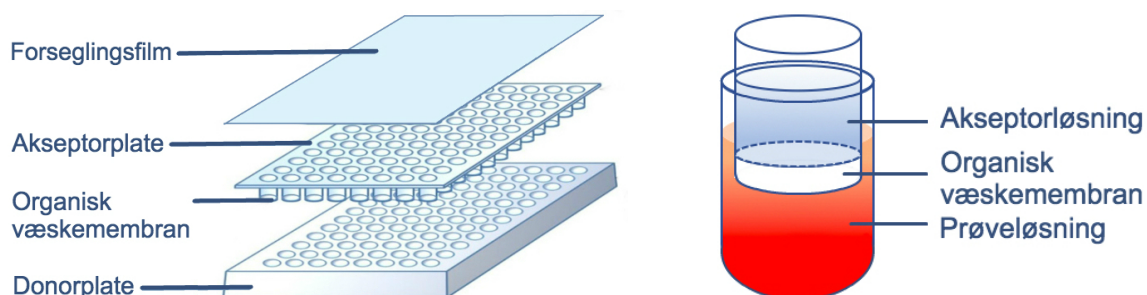
Ekstraksjonssystemet skal tilpasses analyttenes polaritet, syre-base-egenskaper og analyseteknikken som skal anvendes. For analytter med lav polaritet som skal analyseres i GC

brukes et tofase-system med organisk akseptorløsning for at ekstraktet skal være egnet for analyseinstrumentet. For basiske analytter utføres ekstraksjonen med et trefase-system ved å ha en basisk donorløsning som hemmer ionisering, og en sur akseptorløsning. På den måten vil analytter først løse seg i den organiske væskemembranen i nøytral form, deretter protoneres i kontakt med surt miljø, og fordele seg videre i den vandige akseptorløsningen. Optimal løselighet til baser oppnås ved å pH-justere prøveløsning og akseptorløsning til minst to enheter henholdsvis over og under pKa-verdiene til basene [38]. Ettersom akseptorløsningen er kompatibel med LC-MS/MS, kreves det ikke inndamping av organisk løsemiddel før injeksjon. Dersom analyttene har sur karakter, må pH-gradienten reverseres [42].

### 2.1.3 Parallel artificial liquid membrane extraction

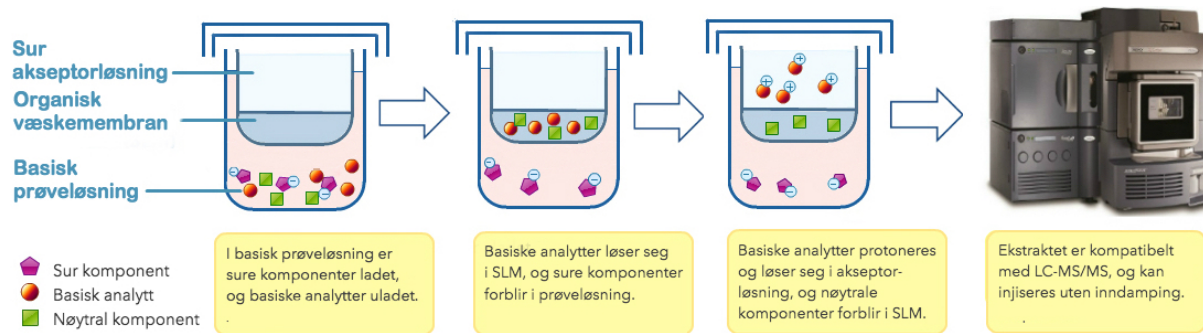
PALME er modifisert fra trefase-systemet i HF-LPME. Til forskjell fra HF-LPME er den organiske væskemembranen inkorporert i et 96-brønnsformat, og dermed oppnås et effektivt system med minimalt forbruk av organisk løsemiddel. PALME gir en god eliminering av fosfolipider og reduserer dermed matrikseffekter ved bruk av LC-MS/MS. [43].

Oppsettet består av en donorplate, en akseptorplate med filtre laget av polyvinyliden difluorid (PVDF) på bunnen, og en forseglingsfilm som hindrer fordamping av akseptorløsning (**Figur 2**). Ved ekstraksjon fylles prøveløsningen i donorbrønnene typisk med et volum på 250  $\mu\text{l}$  i hver brønn. Volumet av akseptorløsningen er vanligvis 50  $\mu\text{l}$ . Dette gir en teoretisk fem ganger oppkonsentrering av analytter, som muliggjør deteksjon av analytter i lave konsentrasjoner i prøveløsningen. En organisk væskemembran dannes ved å pipettere 3-5  $\mu\text{l}$  av organisk løsemiddel på PVDF-filtret, med akseptorplaten vendt opp ned [1]. Løsemiddelet immobiliseres i membranporene og danner en kunstig organisk væskemembran som ikke er blandbar med vann.



**Figur 2: PALME-oppsettet. Venstre: Donorplate, akseptorplate med organisk væskemembran på bunnen og forseglingsfilm. Modifisert fra [6]. Høyre: Skjematisk fremstilling av en enkelt ekstraksjonsbrønn.**

Ved PALME diffunderer analytter fra prøven i donorplaten, gjennom den organiske væskemembranen og inn i akseptorløsningen i akseptorplaten. I likhet med HF-LPME egner ekstraksjonsteknikken seg best for analytter med sure eller basiske egenskaper ettersom pH i analysesystemet er en viktig parameter for optimal ekstraksjon. Ved å justere pH i prøveløsningen og akseptorløsningen dannes det en pH-gradient. Analytter forblir i nøytral form når de fordeler seg i den organiske fasen, og løser seg videre i vandig akseptorløsning i ladet form. Oppsettet ristes i 30-60 minutter for å fremme ekstraksjonen [41]. Siden akseptorløsningen er kompatibel med LC/MS-MS, kan ekstrakter injiseres direkte i analyseinstrumentet uten inndampingstrinnet. Ekstraksjonsprosessen for ekstraksjon av basiske analytter er beskrevet med **Figur 3**.



**Figur 3: Ekstraksjonsprosessen for PALME av basiske analytter.**

Ekstraksjonsutbytte er avhengig av løselighet av analytter i organisk væskemembran og akseptorløsning. Ved å endre ulike ekstraksjonsparametere, for eksempel organisk væskemembran, sammensetning og pH i både akseptor- og donorløsning er det mulig å oppnå høy fordeling av analytter til akseptorløsning og dermed høyt ekstraksjonsutbytte.

## 2.2 Væskrokromatografi

Autentiske prøver inneholder som regel flere analytter i en prøve. For å analysere prøven bør analyttene først separeres ved hjelp av kromatografi. Analysesystemet består av en stasjonærfase og en mobilfase. Stasjonærfasen ligger i ro, og er pakket som porøse partikler i en kolonne. Mobilfasen er fasen i bevegelse, som pumpes gjennom kolonnen med en bestemt hastighet. Når mobilfasen er i væskeform kalles det væskrokromatografi [38].

Under separasjonen transporteres analytter over en stasjonærfase ved hjelp av en flytende mobilfase. Disse to fasene er forskjellige i polaritet. Analytter fordeles forskjellig mellom



stasjonærfase og mobilfase, de som er mer foretrukket av stasjonærfasen retarderes mer. Analyttene vil dermed vandre gjennom kolonnen med ulike hastigheter og når detektoren til ulik tid, slik at de blir separert med en viss avstand i kromatogrammet.

I væskekromatografi, når stasjonærfasen er mer polar enn mobilfasen, kalles det normalfase-kromatografi [44]. Når mobilfasen er mer polar enn stasjonærfasen kalles det følgelig omvendt-fase kromatografi. Omvendt-fase kromatografi muliggjør direkte analyse av vandige prøver, og er nå den mest brukte teknikken i *high performance liquid chromatography* (HPLC) som er apparaturen for væskekromatografi [44]. *Ultra-high performance liquid chromatography* (UHPLC) er en videreutvikling av HPLC for å redusere analysetiden og samtidig øke følsomheten til apparatet [38]. UHPLC ble benyttet i denne oppgaven og er beskrevet nærmere i avsnitt 2.2.3.

Etter separasjonen føres analyttene inn i en detektor som gir et elektrisk signal for analyttene. Signalintensitet måles og dataene blir behandlet av et dataprogram. Detektoren finnes i ulike typer, blant annet UV-detektoren som måler generell respons fra analytter, og massespektrometeret som i tillegg angir molekylvekten til analyttene.

### 2.2.1 Omvendt-fasekromatografi

Omvendt-fase-kromatografi ble brukt som separasjonsmetode i dette arbeidet. Forskjellige C18-materialer er de mest anvendte stasjonærfasene i omvendt-fase kromatografi og disse har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer. I denne oppgaven ble en kolonne med silikapartikler med oktadecylsilika (C18) ligander og «end-capped» materiale (Waters, Aquiy HSS T3) benyttet. Denne kolonnen er kompatibel med 100 % vandig mobilfase, og gir god retensjon av polare analytter. I omvendt-fase-kromatografi er stasjonærfasen mer hydrofob enn mobilfasen, og retensjonen av analytter er blant annet påvirket av elueringsstyrken til mobilfasen, egenskapene til stasjonærfasen, temperaturen i kolonnen og eventuelt pH i mobilfasen.

Mobilfasen er som oftest en blanding av vann og organisk løsemiddel som metanol (MeOH) og acetonitril (ACN). For stoffer med sure eller basiske egenskaper er pH i mobilfasen en viktig parameter for retensjonen. Ved pH som undertrykker ionisering av analytter oppnås størst

retensjon der det er størst hydrofob interaksjon mellom analytt og stasjonærfase. For nøytrale stoffer er retensjonen ikke påvirket av ionisering.

Forskjellige analytter kan ha stor forskjell i retensjonen. Dette skyldes at stoffene fordeles svært forskjellig mellom mobilfasen og stasjonærfasen. Når analytter er sterkt foretrukket i stasjonærfasen, registreres detektorrespons for analyttene som brede og lave topper i kromatogrammet. Når derimot analytter er sterkt foretrukket i mobilfasen, vil ikke analyttene få tid til å separeres og kromatogrammet får dermed topper som ikke er separert fra hverandre. Dette vanskeliggjør analyse av flere analytter samtidig. Mobilfasen består som oftest av et organisk løsemiddel og en vandig løsning. Ved å programmere og endre sammensetning i mobilfasen, kan styrken av mobilfasen endres på forskjellige tidspunkter i elueringen. Analyttenes fordeling mellom mobilfase og stasjonærfase endres følgelig under elueringen. Dette betegnes som gradienteluering og resulterer i kromatogram med smalere og bedre separerte topper [38].

### ***2.2.2 High performance liquid chromatography***

Omvendt-fasekromatografi ble utført med UHPLC i denne oppgaven. Som nevnt tidligere er UHPLC modifisert fra HPLC. HPLC er den mest anvendte metoden for bestemmelse av legemidler i farmasøytiske preparater og i biologisk materiale [38]. Apparaturen er hovedsakelig bygd opp av pumpe, injektor, kolonne og detektor. Ved analyse pumpes mobilfasen med konstant hastighet gjennom kolonnen. Når analyttene injiseres i kolonnen, blir de separert med ulike retensjonshastigheter og detekteres i detektoren. Hele analyseprosessen kan automatiseres og styres av et datasystem. Når en autosampler brukes som injektor kan systemet fungere 24 timer i døgnet [44]. Pakkematerialet i HPLC-kolonnen har partikkelstørrelse i området 3-10  $\mu\text{m}$  [38]. Dette har bidratt til separasjon med høy kvalitet, men har likevel gitt begrensninger i analysetid og effektivitet [38].

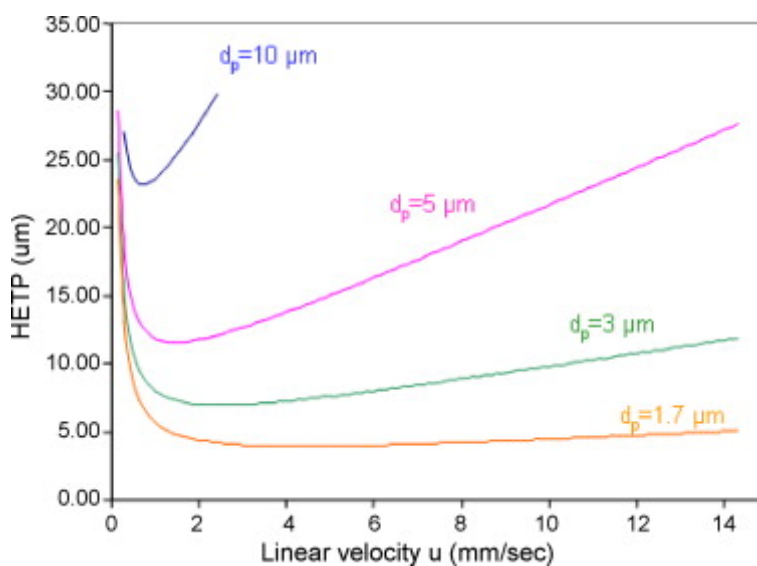
### ***2.2.3 Ultra-high performance liquid chromatography***

I UHPLC er kolonnen pakket med indrediameter typisk i området 1,5-2  $\mu\text{m}$ . Hensikten med enda mindre partikkelstørrelser i forhold til HPLC er å oppnå mindre spredning av analytter i kolonnen (også kalt båndspredning), og dermed bedre og raskere separasjon [38]. Hovedprinsippet i UHPLC er basert på Van Deemters ligning (**Ligning 5**):

Ligning 5 [11]:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Ligningen beskriver den samlede effekten av ulike diffusjonsprosesser som bidrar til analyttenes båndspredning i kolonnen: eddydiffusjon som oppstår ved store irregulære partikler (A), diffusjon i mobilfase (B) og massetransport mellom stasjonærfase og mobilfase (C) [11, 38]. H er høydeekvivalent til en teoretisk plate og indikerer båndspredningen samt kolonnens evne til separasjon. Ved mindre partikkelstørrelse reduseres massetransporten og eddydiffusjonen. Det gir mindre båndspredning som resulterer i bedre separasjonseffektivitet. Sammenhengen mellom høydeekvivalent til en teoretisk plate (H eller HETP) og mobilfasens hastighet (u) er illustrert for ulike partikkelstørrelser i et van Deemters plot i **Figur 4** [11]. Figuren viser at ved mindre partikkelstørrelse oppnås bedre separasjonseffektivitet som er mindre påvirket av mobilfasens hastighet.



**Figur 4: Van Deemters kurver for partikkelstørrelse 10, 5, 3 og 1,7 µm. Hentet fra [11].**

UHPLC gir dermed mulighet for kortere kolonne, høyere hastighet av mobilfasen og mindre båndspredning. Sammenlignet med HPLC er det flere fordeler: analysetiden er kraftig redusert og det kreves mindre forbruk av mobilfase. Den økte separasjonseffektiviteten gjør at analytter koeluerer mindre med forurensninger under ionisering, og dermed oppnås mindre matrikseffekter [27, 45]. Som nevnt er dette svært viktig for analyse av prøver i fullblod.

#### 2.2.4 UV-detektor

UV-detektor er standarden til kvalitetskontroll av rensstoffer og farmasøytiske preparater [38]. I en UV-detektor måles analyttens absorpsjon av UV-stråling ved visse bølgelengder. Responsen til analyttene registreres i form av topper i et kromatogram. Detektoren er selektiv for stoffer som absorberer UV-stråling ved bølgelengder over 190 nm [38]. Signalintensiteten har en proporsjonal sammenheng med konsentrasjonen av analytter. For kvantitative formål bestemmes dermed toppenes areal. Ulike analytter kan ha maksimal absorpsjon ved forskjellige bølgelengder. For å få høyest mulig følsomhet bør flere optimale bølgelengder stilles inn for analyttene.

#### 2.2.5 Væskekromatografi-UV

UV-detektoren er mest brukt i HPLC, og kan detektere de fleste legemidler [38]. Med denne kombinasjonen er det viktig å velge mobilfase som ikke gir respons ved bølgelengden benyttet for analyttene, for eksempel vann og metanol som er lett tilgjengelige og lite toksiske. UV-detektoren er enkel i bruk, men er ofte ikke følsom nok for bioanalyse. Den nedre deteksjonsgrensen er kun ned til 1-100 ng, og biologiske komponenter kan gi interferens i detektoren [38]. I tillegg separerer HPLC og UHPLC ikke alle stoffene, og UV-detektoren gir lite informasjon om kjemiske strukturer til analyttene. Det skaper vansker for selektiv og spesifikk analyse av analytter med tilnærmet like egenskaper, og analyse av analytter i lave konsentrasjoner, spesielt i biologiske materialer.

#### 2.2.6 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analyseteknikk som tar utgangspunkt i ionisering av analytter. Ioniserte analytter separeres og identifiseres basert på forholdet mellom masse over ladning ( $m/z$ ). På den måten kan teknikken skille mellom ioner med forskjellige masser, selv om de koeluerer. Dette er en mer sikker og nøyaktig analyseteknikk i forhold til en UV-detektor [44].

For å kunne bli detektert må analyttene først ioniseres av en ionekilde, enten til positive ioner eller negative ioner. De mest anvendte ioniseringsteknikkene innen LC-MS består av elektroprayionisasjon (*electrospray ionization*, ESI), atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI) og atmosfæretrykk-foto-ionisasjon (*atmospheric pressure photoionization*, APPI). Valg av egnede ionekilder avhenger hovedsakelig av polaritet og størrelse til analyttene [46].

Etter ionisering akselereres ionene inn i en masseanalysator og separeres basert på  $m/z$ -verdier. Masseanalysatoren opereres i vakuum for å unngå kollisjon mellom ioner og molekyler fra luften [44]. Dette sikrer at ionene når frem til detektoren. Mengden av ioner og  $m/z$  verdier av ionene registreres deretter av en detektor. Ulike masseanalysatorer kan benyttes til å separere ionene, blant annet kvadrupol masseanalysator, ionefelle og *time-of-flight* (TOF) [38].

I denne oppgaven benyttes en trippelkvadrupol til tandem massespektrometri (MS/MS). MS/MS benytter to etterfølgende masseanalysatorer for å selektivt analysere fragmenter av bestemte ioner blant ionene som dannes ved ionekilden. Dette er beskrevet nærmere i avsnitt 2.2.9.

### 2.2.7 Væskekromatografi-tandem massespektrometri

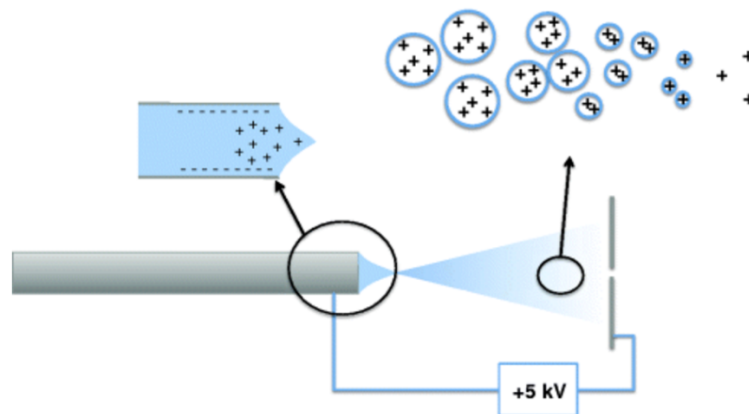
MS brukes ofte i forbindelse med HPLC, og fungerer som en HPLC-detektor [38]. Væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri kalles LC-MS/MS, og er som nevnt ofte anvendt i bioanalyse på grunn av sin følsomhet og selektivitet. I denne oppgaven ble UHPLC benyttet, og teknikken kalles dermed UHPLC-MS/MS.

I en analyse utført med LC-MS/MS separeres analyttene først ved hjelp av væskekromatografi i en kolonne. Etter separasjonen ioniseres analyttene av en ionekilde og detekteres av et tandem massespektrometer. Resultatet oppgis i et kromatogram og massespekter. I et kromatogram er den totale ionestrømmen av analytter presentert som topper og plottes som funksjon av retensjonstid. Topparealene korrelerer med mengden analytter som er detektert. I massespektre plottes intensiteten av ioner i et stolpediagram som funksjon av  $m/z$ -verdi [38]. Dette kan benyttes til identifisering av organiske forbindelser ettersom hvert stoff har eget massespekter.

### 2.2.8 Elektrosprayionisasjon

Som beskrevet i avsnitt 2.2.6 er ionisering av analytter nødvendig for å kunne utføre massespektrometri. I oppgaven ble ESI benyttet som ionekilde siden teknikken har vist seg å kunne gi mer effektiv ionisering og bedre følsomhet enn APCI ved analyse av benzodiazepiner utført med LC-MS/MS [26, 47].

Ved ionisering føres væskestrømmen fra UHPLC-kolonnen inn i et kapillær hvor en høy spenning er påført. Ved utgangen blir væskestrømmen blandet med en gasstrøm typisk bestående av nitrogen. Det dannes en aerosol, slik at ioniserte analytter forlater kapillæret i små dråper med høy elektrisk spenning. En tørkegas introduseres for å fjerne løsemiddelrester fra væskestrømmen [38]. Dråpene fordampes mens de forflytter seg mot masseanalysatoren ved hjelp av en elektrisk spenning. De blir så små at i dråpen vil frastøtende krefter mellom ionene med like ladninger overskride overflatespenningen til dråpen. Dråpen sprekker og det dannes enda mindre dråper. Disse dråpene gjennomgår samme prosess på nytt inntil det kun er ioner igjen. Ionene blir til slutt akselerert mot masseanalysatoren av et elektrisk felt. Prosessen er illustrert i **Figur 5**. For at væskestrømmen skal kunne fordampe, må man velge flyktige mobilfaser som maursyre og ammoniumformat i LC-MS/MS [38].

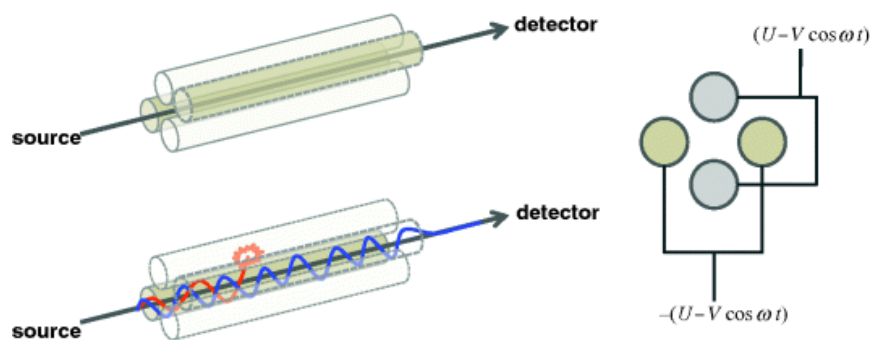


**Figur 5:** Skjematisk illustrasjon av ESI-ionekilde. Hentet fra [46].

ESI kan opereres i både positiv modus og negativ modus. Ved positiv modus blir protonerte molekyler detektert, og ved negativ modus blir deprotonerte molekyler detektert [44]. Som nevnt innledningsvis kan biologiske komponenter konkurrere med analytter om ioniseringen og medføre matrikseffekter, noe som gjør det viktig at ekstraksjonsmetoden gir rene ekstrakter.

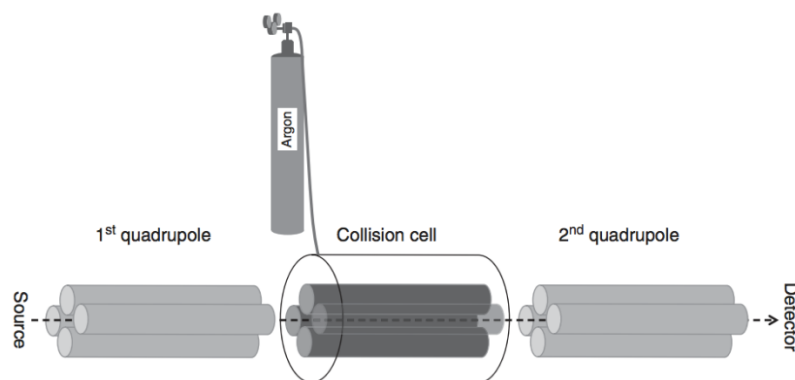
### 2.2.9 Kvadrupolinstrumenter

En kvadrupol er en masseanalysator som separerer ioner basert på  $m/z$ -verdier. Instrumentet består av fire parallelle staver. Motstående staver er koblet sammen og pålagt en spenning, slik at det dannes et elektrisk felt (**Figur 6**). I det elektriske feltet vil ustabile ioner kolliderer med stavnene, mens stabile ioner vil kunne passere stavnene og nå frem til detektoren [38]. Ved å variere spenningene endres det elektriske feltet for å tillate at spesifikke ioner vandrer gjennom kvadrupolen og registreres i detektoren.



**Figur 6: Kvadrupolanalysator. Hentet fra [46].**

Trippelkvadrupolen består av tre etterfølgende kvadrupoler, hvor første og siste kvadrupol fungerer som masseanalysatorer, og midterste kvadrupol som kollisjonscelle. Dette er vist i **Figur 7**. Den første kvadrupolen filtrerer ionene som skal fragmenteres, og ionene føres inn i kollisjonscellen (midterste kvadrupol) som inneholder en inert gass, vanligvis argon ( $\text{Ar}_2$ ). Ved å akselerere ionene i kollisjonscellen, kollideres ionene med gassmolekyler og fragmenteres i mindre ioner. Fragmenterte ioner føres videre til den siste kvadrupolen, hvor ionene separeres og detekteres.



**Figur 7: Skjematisk illustrasjon av trippelkvadrupol massespektrometer. Hentet fra [44].**

Ved å innstille kvadrupolene kan selekterte fragmentioner skannes i ulike moduser som *product ion scan*, *precursor ion scan*, *constant neutral loss*, *single reaction monitoring* (SRM) og *multiple reaction monitoring* (MRM). I denne oppgaven ble MRM benyttet. Ved SRM måler siste kvadrupolen ett eller flere spesifikke produksjoner fra ett selektert ion, mens MRM måler ett eller flere produksjoner fra flere selekterte ioner.

## 2.3 Rusmidler

I oppgaven ble PALME utført for et større utvalg av rusmidler. Rusmiddel er en samlebetegnelse for rusgivende stoffer som hovedsakelig gir sentralnervøs stimulering, demping av sentralnervesystemet og hallusinasjoner [48]. Begrepet omfatter en rekke stoffer som inkluderer alkohol, vanedannende legemidler og narkotiske stoffer som for eksempel kokain, cannabis og amfetamin [49]. Noen eksempler på vanedannende legemidler med ruspotensial er smertestillende legemidler som opioider, metadon og beroligende midler eller sovemidler som benzodiazepiner. Benzodiazepiner står sentralt i denne kategorien og er ofte blitt misbrukt i kombinasjon med andre rusmidler [49].

Rusmiddelbruk er ofte assosiert med sosiale skader og helsemessige konsekvenser, blant annet psykiske plager eller lidelser, fysiske skader og ikke minst sykdommer [16]. Det kan være dødsfall ved overdosering, aggressiv atferd i forbindelse med hallusinasjoner eller smittsomme sykdommer ved sprøytebruk. I de siste årene har det vært en økning i rusmiddelbruk, noe som også medfører økende kriminalitet og vold [49]. Mange rusmidler er i tillegg vanedannende, noe som kompliserer tiltak og kontroll i høyere grad. Inntak av rusmidler, inkludert alkohol, gir økt risiko for trafikkulykker. Blant stoffer som finnes i saker der det er mistanke om kjøring i påvirket tilstand er benzodiazepiner de mest detekterte legemidlene [50]. Stoffene gir lite akutt toksisitet i seg selv, men ved kombinasjon av alkohol og flere illegale stoffer økes risiko for trafikkulykker betydelig [17, 18]. Antall sjåførere som er pågrepet på grunn av mistanke om påvirkning av andre rusmidler, har de siste årene vært rundt 4000 tilfeller per år i Norge [51]. Rusmidlene benyttet i oppgaven ble delt i benzodiazepiner og basiske upolare substanser basert på kjemiske egenskaper.

### 2.3.1 Benzodiazepiner

Benzodiazepiner virker dempende på nervesystemet og gir beroligende, angstdempende, søvnfremmende, krampestillende og muskelavslappende effekt. Som legemidler brukes benzodiazepiner omfattende som sovemedisin, beroligende middel og til behandling av epilepsi [16]. Benzodiazepiner har et bredt terapeutisk vindu og anses å være relativt trygge i bruk [22]. Til tross for dette er stoffene noen av de mest misbrukte legemidlene, noe som gir økt risiko for overdose [16]. Særlig ved kombinasjon med andre rusmidler kan den dempende effekten i sentralnervesystemet forsterkes og medføre betydelig døsighet og i ytterste konsekvens alvorlig



helseerisiko [22]. Dette gjør at benzodiazepiner ofte er forbundet med dødsfall, kriminalitet og trafikkulykker [50].

Benzodiazepiner som er tilgjengelige på det norske markedet inkluderer diazepam, oksazepam, klonazepam, alprazolam og nitrazepam. I tillegg til disse, har det siden 2012 vært en økning i designerbenzodiazepiner som omsettes på det illegale markedet [52]. Stoffene selges i stor grad via internett som alternativer til reseptbelagte benzodiazepiner. De første designerbenzodiazepinene som ble solgt på internett var diklazepam, flubromazepam og pyrazolam [14]. Kort tid etter at de ble ansett som ulovlige i ulike land, har flere andre designerbenzodiazepiner også blitt tilgjengelige [52]. Designerbenzodiazepiner som ble undersøkt i oppgaven inkluderer fenazepam, etizolam, diklazepam, flubromazepam, klonazolam, deskloretizolam, flubromazolam og meklonazepam. Benzodiazepinanalogene etizolam og deskloretizolam er tienodiazepinderivater, men er regnet som benzodiazepiner [53]. Designerbenzodiazepiner har ofte høy potens. Klonazolam og flubromazolam kan for eksempel forårsake sterk sedasjon og hukommelsestap ved oralt inntak på kun 0,5 mg [14]. 7-aminoklonazepam ble også tatt med i de innledende forsøkene, da det er hovedmetabolitten til klonazepam som kan finnes både i blod og urin [54].

Det er også utviklet benzodiazepinlignende stoffer som har samme virkningsmekanisme, blant dem er kun zolpidem og zopiklon markedsført i Norge. Zolpidem og zopiklon, også kalt z-hypnotika ble introdusert etter benzodiazepiner for å kunne gi mindre «dagen derpå»-effekter med mindre halveringstid. Imidlertid har økning i salg og høyt forbruk blant eldre tydet på at bruk av z-hypnotika likevel gir risiko for avhengighet og misbruk [55].

### 2.3.2 Basiske upolare substanser

I oppgaven ble basiske upolare substanser undersøkt i innledende forsøk. Stoffene som ble brukt til innledende forsøk inkluderer alfa-PVP, DMT, etylfenidat, kokain, ketamin, MDPV, metadon og metamfetamin. Disse stoffene er stort sett stimulerende og hallusinogener, unntatt metadon. Metadon er et syntetisk opioid som gir dempende effekt. Stoffet har lang halveringstid og brukes i substitusjonsbehandling. Som alle andre opioider kan metadon svekke pustesenteret i hjernen og medføre dødsfall [16].

Stimulerende stoffer inkluderer alfa-PVP, etylfenidat, kokain, MDPV og metamfetamin. Stimulering i nervesystemet gir hevet stemningsleie, økt våkenhet, bedret selvfølelse og nedsatt appetitt [56]. Metamfetamin er et av de vanligste ulovlige rusmidlene. Stoffet kan virke på hjerte og blodkar og øker risiko for hjerneblødning, samt alvorlige hjertesykdommer. Kokain er et kraftig stimulerende stoff som inntas ved røyking, injisering eller sniffing. Ved inntak kan stoffet gi hurtig innsettende og kraftig rus, med stor fare for avhengighetsutvikling [16]. Etylfenidat, Alfa-PVP og MDPV er inkludert i nye psykoaktive substanser (NPS), en gruppe nye rusmidler fra det illegale narkotikamarkedet. Alfa-PVP og MDPV er syntetiske katinoner som gir eufori, bedret humør, bevegelsestrang, økt seksuell lyst, agitasjon, klare tanker og økt pratsomhet [57]. Etylfenidat er analog til metylfenidat, samtidig kan stoffet finnes som metabolitt av metylfenidat inntatt i kombinasjon med alkohol [58]. Metylfenidat brukes til behandling av ADHD. På grunn av sin stimulerende effekt har etylfenidat og metylfenidat blitt misbrukt, og det er rapportert dødsfall i forbindelse med dette [59].

DMT hører også til NPS, men er et tryptamin som gir kraftige hallusinasjoner med intensiverte sanseinntrykk, eufori, økt kreativitet og økt libido samt en opplevelse av indre ro [57]. Ketamin gir både stimulerende, dempende effekt og hallusinasjoner. Som legemiddel benyttes stoffet som bedøvelsesmiddel ved kirurgi. I dag er bruk av ketamin som rusmiddel velkjent i verden. Dette gir økt risiko for akutt toksisitet, skade i sentralnervesystemet og ulike organer i kroppen ved langvarig bruk. I tillegg er det risiko for utvikling av toleranse og avhengighet [60].

## 3 Eksperimentelt

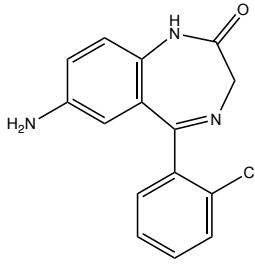
### 3.1 Karakteristikk av analytter

Tabell 3.1: Fysiokjemiske egenskaper av basiske upolare substanser [61].

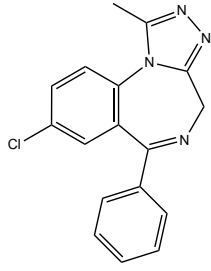
Modellanalytt	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	pKa	Log P
Alfa-PVP	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO	231,3	7,9	3,4
DMT	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>	188,3	9,6	2,3
Etylfenidat	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>2</sub>	247,3	9,1	2,6
Ketamin	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> ClNO	237,7	7,5	3,4
Kokain	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	303,4	8,9	2,3
MDPV	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	275,3	7,3	3
Metadon	C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> NO	309,5	9,1	5
Metamfetamin	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N	149,2	10,2	2,2

Tabell 3.2: Fysiokjemiske egenskaper av benzodiazepiner og z-hypnotika [61].

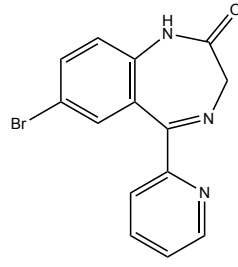
Modellanalytt	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	Sterkest basisk pKa	Log P
7-aminoklonazepam	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> O	285,7	3,4	2,4
Alprazolam	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>4</sub>	308,8	5,0	3,0
Bromazepam	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>3</sub> O	316,2	2,7	2,5
Deskloretizolam	C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> S	308,4	5,4	3,5
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	284,7	2,9	3,1
Diklazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O	319,2	2,1	3,7
Etizolam	C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> ClN <sub>4</sub> S	342,9	4,6	4,1
Fenazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> BrClN <sub>2</sub> O	349,6	2,1	4,3
Flubromazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> BrFN <sub>2</sub> O	333,2	2,9	4,0
Flubromazolam	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> BrFN <sub>4</sub>	371,2	4,0	3,3
Flunitrazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	313,3	1,7	2,6
Klonazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	315,7	1,9	3,2
Klonazolam	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	353,8	4,1	3,0
Lorazepam	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	321,2	-2,2	3,5
Meklonazepam	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	329,7	1,7	4,2
Midazolam	C <sub>18</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub>	325,8	6,2	4,0
N-desmetyldiazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	270,7	2,9	3,2
Nitrazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	281,3	2,7	2,6
Oksazepam	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	286,7	-1,5	2,9
Zolpidem	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O	307,4	5,4	3,0
Zopiklon	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	388,8	6,9	0,5



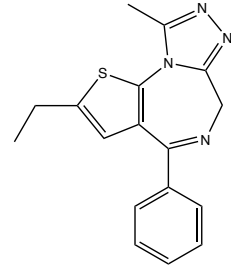
7-aminoklonazepam



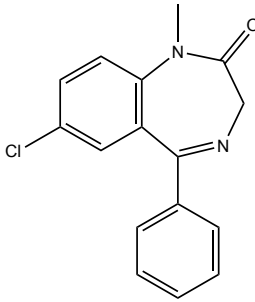
Alprazolam



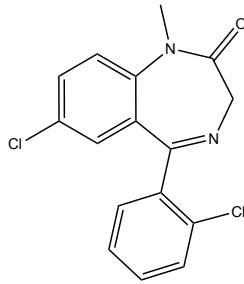
Bromazepam



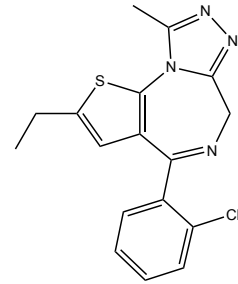
Deskloretizolam



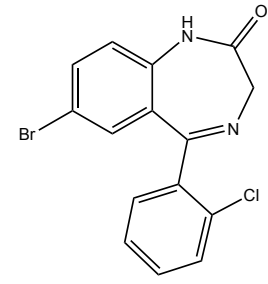
Diazepam



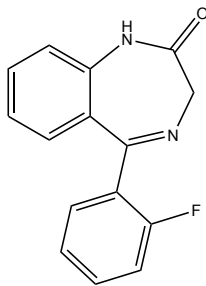
Diklazepam



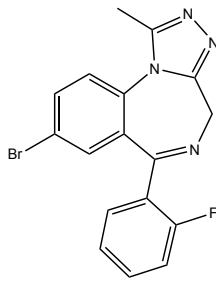
Etizolam



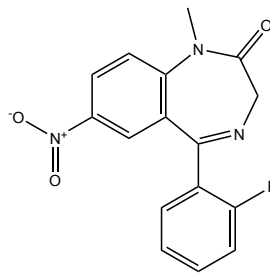
Fenazepam



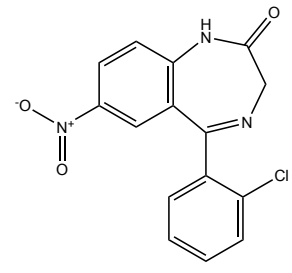
Flubromazepam



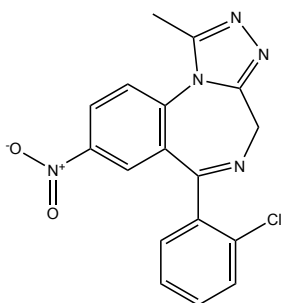
Flubromazolam



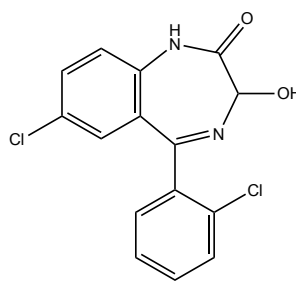
Flunitrazepam



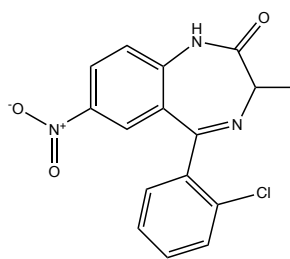
Klonazepam



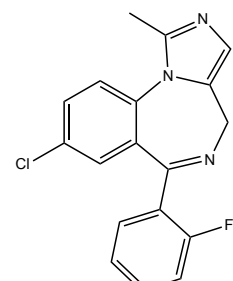
Klonazolam



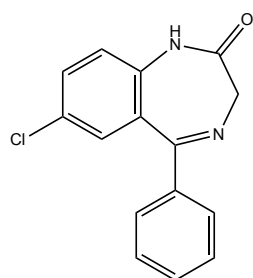
Lorazepam



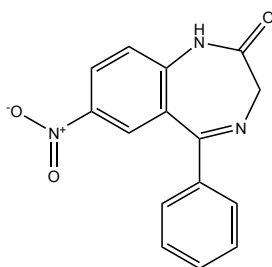
Meklonazepam



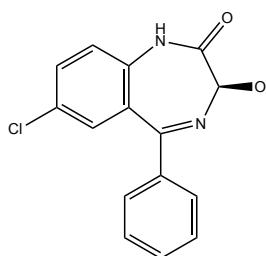
Midazolam



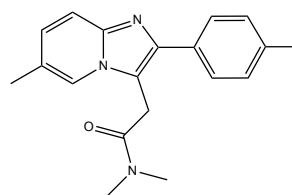
N-desmetyldiazepam



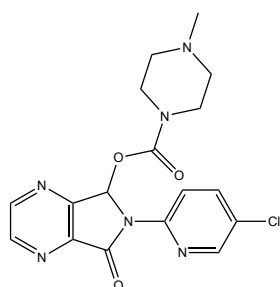
Nitrazepam



Oksazepam



Zolpidem



Zopiklon

**Figur 8: Kjemiske strukturer av benzodiazepiner og z-hypnotika.**

## 3.2 Utstyr

**Tabell 3.3: Utstyr for PALME-oppsettet.**

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	Produksjonssted
<b>Donorplate</b>	96 well plates, 0,50 mL, polypropylene	Agilent	Santa Clara, CA, USA
<b>Akseptorplate</b>	MAIPN4550 96-well MultiScreen-IP Filter Plate with 0,45 µm pore size, hydrophobic PVDF membrane, Non-sterile	Merck Millipore	Darmstadt, Tyskland
<b>Forseglingsfilm</b>	Platemax pierceable Aluminium Sealing Film, non-sterile, aluminium foil	Axygen	Central Avenue Union City, CA, USA

**Tabell 3.4: Diverse forbruksmateriell.**

Forbruksmateriell	Beskrivelse	Produsent	Produksjonssted
<b>Insert</b>	Micro-Insert, 0,1 mL, clear glass 15 mm, top	VWR	Radnor, PA, USA
<b>Vial i glass</b>	32 x 11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge

<b>Vial i plast</b>	Polypropylene vial with snap cap, 300 µl, PTFE / Silicon septa	Waters	Milford, MA, USA
<b>Eppendorfrør</b>	Micro-tubes with lid closure	BRAND	Wertheim, Tyskland
<b>Plastrør</b>	Tube, 4.5 ml, 75 x 12 mm, conical base, PP	Sarstedt	Hildesheim, Tyskland
<b>96-brønnsplate til autosamplers</b>	Nunc 96-Well Polypropylene MicroWell Plates, non-sterile, 450 µl, V-bottom	Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY, USA
<b>Forseglingsfilm</b>	Rapid Slit Seal 80 mm x 122 mm non-sterile	Biochromato	Kanagawa-ken, Japan
<b>Reagent reservoir til 8-kanalpipette</b>	25 mL PS, non-sterile	VWR	Radnor, PA, USA
<b>Reagent reservoir til 96-kanalpipette</b>	Non-sterile, low profile 96 pyramidal bottoms	Mettler-Toledo	Oakland, CA, USA
<b>Pipettespisser til finnpipette og 8-kanalpipette uten filter</b>	Optifit Refill Tips	Sartorius	Helsinki, Finland
<b>Pipettespisser til finnpipette med filter</b>	Barrier Tip, Filtered, Sterile, 96 tips, 200 µl	Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY, USA
<b>Pipettespisser til multipipette</b>	Eppendorf	Labsystems	Vantaa, Finland
<b>Pipettespisser til 96-kanalpipette</b>	Liquidator 96-well Platform Tips, Max. Volume: 200 µl	Mettler-Toledo	Oakland, CA, USA

**Tabell 3.5: Annet utstyr.**

<b>Utstyr</b>	<b>Beskrivelse</b>	<b>Produsent</b>	<b>Produksjonssted</b>
<b>Analysevekt</b>	AE200	Mettler Toledo	Oslo, Norge
<b>Vortexmikser</b>	MS 3 basic	IKA	Wilmington, NC, USA
<b>Ristemaskin</b>	Vibramax 100	Heidolph	Schwabach, Tyskland
<b>96-kanalpipette</b>	Liquidator 96-channel Manual Pipetting System, 5-200 µL	Mettler Toledo	Oakland, CA, USA
<b>Finnpipette</b>	Biohit	Labsystems	Vantaa, Finland
<b>8-kanalpipette</b>	Sartorius mLINE 8-Channel Pipettor, 30-300µl	Sartorius	Helsinki, Finland
<b>Multipipette</b>	Xstream Eppendorf Multipipette	VWR	Radnor, PA, USA

### 3.3 Kjemikalier

Tabell 3.6: Diverse kjemikalier.

Kjemikalie	Kvalitet	Produsent	Produksjonssted
1-undekanol	99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Acetonitril	Hypergrade for LC-MS	Merck	Darmstadt, Tyskland
Bis(2-etylheksyl)fosfit	96 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Di-natriumhydrogenfosfat	Pro analysi	Merck	Darmstadt, Tyskland
Diheksyleter	97 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Dimetylsulfoksid	Dried (max. 0,05 % H <sub>2</sub> O)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Dodecylacetat	≥ 98 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Etanol	96 %	Arcus	(Oslo, Norge)
Heksadekan	99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Isopentylbenzen	≥97 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Maursyre	For mass spectrometry	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumdihydrogenfosfat	Pro analysi	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid	Pellet, min. 98 %	VWR	Leuven, Belgia
Pentylbenzen	99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trioktylamin	Alamine 300	Cognis	Cincinnati, OH, USA
Undekanon	99 %	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

### 3.4 Løsninger

#### 3.4.1 Stamlløsninger

Stamløsning av hver enkelt analytt var tilgjengelig fra Oslo Universitetssykehus (OUS). Alle stoffene, unntatt zolpidem og zopiklon, var løst i MeOH i ulike konsentrasjoner. Både zolpidem og zopiklon er følsomme for lys, og zopiklon degraderes i MeOH. Stoffene ble derfor løst i

ACN i glassbeholder som var dekket med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys. Stamløsningene ble oppbevart ved 4 °C.

### 3.4.2 Arbeidsløsning

For benzodiazepiner:

Det ble laget konsentrerte arbeidsløsninger som kunne brukes til senere tillaging av standardløsninger. Stoffene ble delt i tre grupper med hensyn til stabilitet og praktisk bruk bestående av lavdoserte benzodiazepiner, høydoserte benzodiazepiner og z-hypnotika.

Det ble laget en arbeidsløsning for hver gruppe ved å lage fortynninger av stamløsningene. Konsentrasjon av analyttene i arbeidsløsningene er vist i **Tabell 3.7**. Stamløsningene til lavdoserte og høydoserte benzodiazepiner ble fortynnet med MeOH. Stamløsningene til z-hypnotika ble fortynnet med ACN i en beholder som ble dekket med aluminiumsfolie.

**Tabell 3.7: Gruppering av benzodiazepiner og z-hypnotika.**

Gruppe I		Gruppe II		Gruppe III	
Lavdoserte	µg/ml	Høydoserte	µg/ml	Z-hypnotika	µg/ml
Deskloretizolam	8	Alprazolam	30	Zolpidem	50
Diklazepam	8	Bromazepam	30	Zopiklon	10
Etizolam	8	Diazepam	30		
Fenazepam	8	Lorazepam	30		
Flubromazolam	8	Midazolam	30		
Flubromazepam	8	N-desmetyldiazepam	30		
Flunitrazepam	8	Nitrazepam	30		
Klonazepam	8	Oksazepam	200		
Klonazolam	8				
Meklonazepam	8				

### 3.4.3 Standarder og kontroller

#### Til innledende forsøk og optimaliseringsforsøk

Basiske upolare substanser:

En standard med alle stoffene ble laget ved å tilsette stamløsningen av hvert enkelt stoff til en kolbe. Blandingen ble fortynnet med 10 mM NaOH til et volum på 10 ml, slik at det ble en løsning med konsentrasjon 0,5 µg/ml for alle stoffene. Standarden ble brukt direkte som prøveløsning. Andre standarder i lavere konsentrasjonsnivå ble laget ved videre fortynning av standarden. Standarden ble oppbevart ved 4°C.



Benzodiazepiner:

Det ble laget en standard med like konsentrasjoner for de enkelte benzodiazepinene. Stammløsningene til alle stoffer ble pipettert i en kolbe og fortynnet med bufferløsning til ønsket volum slik at sluttkonsentrasjonen ble 1 µg/ml.

### Til valideringsforsøk

En bruksløsning med alle benzodiazepinene ble først laget ved å fortynne arbeidsløsningene til lavdoserte, høydoserte stoffer og z-hypnotika med vann i et eppendorfrør. Bruksløsningen ble fortynnet videre for å lage en bruksløsning til hvert konsentrasjonsnivå. Standarder og kontroller ble til slutt laget ved å fortynne bruksløsningene i fullblod i forholdet 1:9 (v/v). Oversikt over analyttenes konsentrasjoner i standardene og kontrollene er oppgitt henholdsvis i **Tabell 3.8** og **Tabell 3.9**.

**Tabell 3.8: Konsentrasjoner (ng/ml) i fullblodprøver for standarder brukt til valideringsforsøk.**

Forbindelse	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard	Standard
	1	2	3	4	5	6
Alprazolam	15	20	50	150	353	600
Bromazepam	15	20	50	150	353	600
Deskloretizolam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Diazepam	15	20	50	150	353	600
Diklazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Etizolam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Fenazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Flubromazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Flubromazolam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Flunitrazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Klonazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Klonazolam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Lorazepam	15	20	50	150	353	600
Meklonazepam	2,0	2,7	6,7	20	47	80
Midazolam	15	20	50	150	353	600
N-desmetyldiazepam	15	20	50	150	353	600
Nitrazepam	15	20	50	150	353	600
Oksazepam	100	133	333	1000	2353	4000
Zolpidem	25	33	83	250	588	1000
Zopiklon	5,0	6,7	17	50	118	200

**Tabell 3.9: Konsentrasjoner (ng/ml) i fullblodprøver for kontroller brukt til valideringsforsøk.**

Forbindelse	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
Alprazolam	24	50	200	462
Bromazepam	24	50	200	462
Deskloretizolam	3,2	6,7	27	62
Diazepam	24	50	200	462
Diklazepam	3,2	6,7	27	62
Etizolam	3,2	6,7	27	62
Fenazepam	3,2	6,7	27	62
Flubromazepam	3,2	6,7	27	62
Flubromazolam	3,2	6,7	27	62
Flunitrazepam	3,2	6,7	27	62
Klonazepam	3,2	6,7	27	62
Klonazolam	3,2	6,7	27	62
Lorazepam	24	50	200	462
Meklonazepam	3,2	6,7	27	62
Midazolam	24	5,0	200	462
N-desmetyldiazepam	24	50	200	462
Nitrazepam	24	50	200	462
Oksazepam	160	333	1333	3077
Zolpidem	40	83	333	769
Zopiklon	8,0	17	67	154

#### 3.4.4 Internstandarder

To bruksløsninger med internstandarder var tilgjengelig fra OUS. En bruksløsning inneholdt internstandarder til flere benzodiazepiner, en annen bruksløsning inneholdt internstandarder til z-hypnotika. Ettersom løsningene var konsentrerte, ble bruksløsningene fortynnet med vann før bruk. Internstandarder som ble inkludert er oppsummert i **Tabell 3.10**.

**Tabell 3.10: Konsentrasjoner av internstandarder etter fortynning i vann.**

Forbindelse	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	Konsentrasjon (ng/ml)
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	C <sub>10</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>2</sub> O	290,8	50
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -klonazepam	C <sub>9</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	321,7	33
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -N-desmetyldiazepam	C <sub>9</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O	276,7	3075
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -oksazepam	C <sub>9</sub> <sup>13</sup> C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	292,7	150
Alprazolam-d5	C <sub>17</sub> D <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>4</sub>	313,7	46
Flunitrazepam-d7	C <sub>16</sub> D <sub>7</sub> H <sub>5</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	320,2	19
Lorazepam-d4	C <sub>15</sub> D <sub>4</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	325,2	56
Nitrazepam-d5	C <sub>15</sub> D <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	286,2	70
Zolpidem-d6	C <sub>19</sub> D <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O	313,4	0,16
Zopiklon-d8	C <sub>17</sub> D <sub>8</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	396,9	0,09

### 3.4.5 Fullblod og plasma

Fullblod og plasma ble levert fra blodbanken ved Ullevål sykehus. De ble oppbevart i fryser ved -20 °C og tint før bruk.

### 3.4.6 Organisk væskemembran

Rene organiske løsemidler med 1 % trioktylamin (TOA) (w/w) som benyttes som organisk væskemembran var tilgjengelige fra Farmasøytisk institutt. Organisk væskemembran som bestod av undekanon og diheksyleter i forholdet 1:1 (w/w), med 1 % TOA ble laget ved å først veie inn 0,01 g TOA i en glassbeholder. Ut i fra eksakt vekt av TOA ble teoretisk vekt av undekanon og diheksyleter beregnet slik at det ble 1 % TOA i endelig løsning. Undekanon og diheksyleter ble veid inn i forholdet 1:1 og tilsatt i samme beholder. Andre blandinger av organiske løsemidler ble laget på tilsvarende måte.

## 3.5 Instrumentelle betingelser

I denne oppgaven ble både UHPLC-UV og UHPLC-MS/MS benyttet. I innledende forsøk og optimaliseringsforsøk ble UHPLC-UV stort sett anvendt for analyse, og i metodevalideringen ble analysene utført med UHPLC-MS/MS.

### 3.5.1 UHPLC-UV-betingelser

UHPLC-instrumentet var Dionex Ultimate 3000 fra Thermo Fisher (Sunnyvale, CA, USA). Behandling av data ble utført med kromatografidatasystemet Chromeleon fra Thermo Fisher. Gradient eluering ble utført på en 100 mm Aquity UPLC HSS T3 kolonne fra Waters (Wexford, Irland), med partikkelstørrelse på 1,8 µm og indre diameter på 2,1 mm.

For både basiske upolare substanser og benzodiazepiner ble injeksjonsvolumet satt til 10 µl, og kolonnetemperatur ble satt til 65°C. Analyse ble utført med UV-bølgelengden 200 nm, og for basiske upolare substanser ble bølgelengden 214 nm også benyttet. Mobilfase A bestod av 20 mM HCOOH og MeOH i forholdet 95:5 (v/v), og mobilfase B bestod av 20 mM HCOOH og MeOH i forholdet 5:95 (v/v). Elueringsgradientene for basiske upolare substanser og benzodiazepiner er vist i henholdsvis **Tabell 3.11** og **Tabell 3.12**.

**Tabell 3.11: Elueringsgradient for basiske upolare substanser med analysetid 8,0 minutter.**

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	15	85	0,50
2,00	75	25	0,50
2,10	90	10	0,50
4,00	90	10	0,50
4,10	15	85	0,50
8,00	15	85	0,50

**Tabell 3.12: Elueringsgradient for benzodiazepiner med analysetid 9,0 minutter.**

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	25	75	0,50
1,50	55	45	0,50
3,50	55	45	0,50
3,60	100	0	0,50
4,50	100	0	0,50
4,60	25	75	0,50
9,00	25	75	0,50

### 3.5.2 UHPLC-MS/MS-betingelser

Et Waters Acquity UHPLC-instrument (Milford, MA, USA) koblet til Waters Xevo TQS trippelkvadrupol massespektrometer (Milford, MA, USA) ble benyttet for metodevalidering for benzodiazepiner. Gradienteluering ble utført på samme kolonne som ble benyttet i innledende forsøk, en Acquity HSS T3 kolonne fra Waters.

#### UHPLC-betingelser

Injeksjonsvolumet ble satt til 2 µl og separasjon ble utført med kolonnetemperatur på 65°C. Weak wash som bestod av MeOH og vann i forholdet 10:90 (v/v) ble satt til 600 µl. Strong wash som bestod av MeOH og vann i forholdet 90:10 (v/v) ble satt til 200 µl. 10 mM ammoniumformat-buffer med pH 3,1 ble valgt som mobilfase A, og MeOH ble valgt som mobilfase B. Elueringsgradienten for benzodiazepiner er vist i **Tabell 3.13**.

**Tabell 3.13: Elueringsgradient for benzodiazepiner med analysetid 4,1 minutter.**

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	95	5	0,50
0,20	40	60	0,50
2,50	20	80	0,50
2,51	2	98	0,50
3,00	2	98	0,50
3,10	95	5	0,50
3,30	95	5	0,50

#### MS/MS-betingelser

Deteksjon ble utført med elektrospyionisasjon i MRM modus ved hjelp av positiv ionisering. Det ble brukt to overganger for hver forbindelse som vist i **Tabell 3.14**. En liste av internstandarder som ble benyttet er vist i **Tabell 3.15**. Kapillærspenning ble satt til 1 kV og desolveringstemperatur til 500°C, mens ionekildetemperatur ble satt til 150°C. «Cone gas flow» var 150 liter/time, og «desolvation gas flow» var 1000 liter/time.

**Tabell 3.14: Diverse MS/MS-betingelser for den enkelte forbindelse.**

Forbindelse	Internstandard	Funksjons-tid (min)	Overgang (Da)	Cone (V) <sup>a</sup>	Coll (eV) <sup>b</sup>
Alprazolam	Alprazolam-d5	1,0 – 1,9	309,10 > 205,10	50	37
			309,10 > 281,10	50	27
Bromazepam	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,1 – 1,6	318,00 > 209,10	45	22
			318,00 > 290,10	45	18

<b>Deskloretizolam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,3 – 2,0	309,20 > 225,10	40	40
			309,20 > 280,10	40	25
<b>Diazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,7 – 3,1	285,00 > 154,00	45	28
			285,00 > 193,00	45	32
<b>Diklazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,3 – 1,7	319,24 > 153,80	40	31
			319,24 > 227,00	40	33
<b>Etizolam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,4 – 2,0	343,11 > 206,10	40	26
			343,11 > 314,10	40	24
<b>Fenazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,4 – 2,1	351,00 > 179,10	50	40
			351,00 > 206,10	50	37
<b>Flubromazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,4 – 2,0	335,10 > 179,10	45	40
			335,10 > 186,10	45	40
<b>Flubromazolam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,3 – 1,8	371,09 > 222,97	60	47
			371,09 > 292,03	60	31
<b>Flunitrazepam</b>	Flunitrazepam-d7	1,0 – 1,6	309,20 > 239,10	40	30
			309,20 > 268,10	40	25
<b>Klonazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -klonazepam	1,0 – 1,7	316,00 > 214,00	45	37
			316,00 > 270,00	45	25
<b>Klonazolam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,0 – 1,5	354,08 > 279,08	40	20
			354,08 > 308,08	40	20
<b>Lorazepam</b>	Lorazepam-d4	1,3 – 1,7	321,00 > 275,00	35	17
			321,00 > 303,00	35	13
<b>Meklonazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,2 – 1,8	330,10 > 270,00	45	25
			330,10 > 284,10	45	20
<b>Midazolam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	1,3 – 1,7	326,00 > 249,00	45	40
			326,00 > 291,00	45	25
<b>N-desmetyldiazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -N-desmetyldiazepam	1,5 – 2,2	271,00 > 140,00	45	28
			271,00 > 165,00	45	28
<b>Nitrazepam</b>	Nitrazepam-d5	1,1 – 1,7	282,00 > 180,10	40	35
			282,00 > 236,10	40	20
<b>Oksazepam</b>	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -oksazepam	1,2 – 1,9	287,00 > 104,00	35	35
			287,00 > 163,00	35	35
<b>Zolpidem</b>	Zolpidem-d6	0,0 – 1,2	308,20 > 236,00	25	34
			308,20 > 264,00	25	26
<b>Zopiklon</b>	Zopiklon-d8	0,5 – 1,1	389,10 > 245,00	15	18
			389,10 > 345,00	15	8

<sup>a</sup>Cone-spenning i volt (V).

<sup>b</sup>Kollisjonsenergi i elektronvolt (eV).

**Tabell 3.15: Diverse MS/MS-betingelser for den enkelte internstandard.**

Forbindelse	Funksjonstid (min)	Overgang (Da)	Cone (V) <sup>a</sup>	Coll (eV) <sup>b</sup>
Alprazolam-d5	2,0 – 6,0	316,10 > 288,10	50	27
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -diazepam	3,0 – 7,0	291,00 > 199,00	45	30
Flunitrazepam-d7	2,0 – 5,0	321,10 > 275,10	35	25
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -klonazepam	1,0 – 5,0	322,00 > 276,00	45	25
Lorazepam-d4	2,0 – 6,0	327,00 > 281,00	35	17
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -N-desmetyldiazepam	2,0 – 6,0	277,00 > 126,00	45	30
Nitrazepam-d5	2,0 – 6,0	287,00 > 185,00	50	30
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -oksazepam	2,0 – 6,0	293,00 > 247,00	25	20
Zolpidem-d6	0,0 – 3,0	314,20 > 235,20	42	36
Zopiklon-d8	0,0 – 4,0	397,20 > 245,00	16	20

<sup>a</sup>Cone-spenning i volt (V).<sup>b</sup>Kollisjonsenergi i elektronvolt (eV).

### 3.6 Utførelse av PALME

I oppgaven ble det utviklet en PALME-metode for ekstraksjon av benzodiazepiner fra vandige prøveløsninger, fullblodprøver og ved bruk av en 96-kanalpipette. Ekstraksjonsprosedyrene er beskrevet i videre avsnitt.

#### 3.6.1 PALME fra vandige prøveløsninger

Prøveløsningen ble laget ved å fortynne alle stamløsningene i 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5 i en kolbe til en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml. Det ble tilsatt 250 µl prøveløsning i hver brønn i en donorplate ved hjelp av en 8-kanalpipette. En organisk væskemembran ble laget ved å tilsette 3 µl undekanon blandet med diheksyleter i forholdet 1:1 med 1 % TOA på PVDF-filtret som ligger på bunnen av akseptorplaten, med platen vendt opp ned. DMSO blandet med 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 (v/v) ble benyttet som akseptorløsning, hvorav 100 µl ble tilsatt i hver akseptorbrønn. Donorplaten og akseptorplaten ble satt sammen, og akseptorplaten ble forsegleet for å hindre søl og væskefordamping.

Oppsettet ble satt på risting i 45 minutter på en ristemaskin. Ristehastigheten ble satt på nivå 8 som tilsvarer omtrent 900 rpm. Etter ekstraksjonen ble 75 µl av hvert ekstrakt overført til vialer, og fortynnet med 75 µl 200 mM HCOOH i forholdet 1:1 (v/v). Ekstraktene ble analysert med UHPLC-UV. En oppsummering av ekstraksjonsparametere for PALME fra vandige prøveløsninger er vist i **Tabell 3.16**.

**Tabell 3.16: Ekstraksjonsparametere for PALME fra vandige prøveløsninger.**

	Betingelser	Volum ( $\mu\text{l}$ )
<b>Prøveløsning</b>	Standard løst i 50 mM fosfatbuffer pH 7,5	250
<b>Akseptorløsning</b>	DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	100
<b>Organisk væskemembran</b>	Undekanon:diheksyleter 1:1 (w/w) + 1 % TOA (w/w)	3
<b>Ekstraksjonstid</b>	45 min (900 rpm)	

### 3.6.2 PALME fra fullblod

Fullblodprøver ble laget ved å fortynne bruksløsninger i fullblod i forholdet 1:9 (v/v). I donorbrønnen ble det tilsatt 100  $\mu\text{l}$  fullblodprøver, 130  $\mu\text{l}$  50 mM fosfatbuffer med pH 7,5 og 20  $\mu\text{l}$  internstandard. Sluttvolumet i prøveløsningen ble 250  $\mu\text{l}$ . Det ble tilsatt 3  $\mu\text{l}$  organisk fase bestående av undekanon og diheksyleter i forholdet 1:1 med 1 % TOA på PVDF-filtret med akseptorplaten vendt opp ned. I akseptorbrønnen ble det tilsatt 100  $\mu\text{l}$  blanding av DMSO og 200 mM HCOOH i forholdet 75:25. Platene ble satt sammen, forseglet og satt på risting i 60 minutter. Etter ekstraksjonen ble ekstraktene overført til vialer og fortynnet med 200 mM HCOOH i forholdet 1:1 (v/v). Ekstraktene ble analysert med LC-MS/MS. En oppsummering av ekstraksjonsparametere for PALME fra fullblod er vist i **Tabell 3.17**.

**Tabell 3.17: Ekstraksjonsparametere for PALME fra fullblod.**

	Betingelser	Volum ( $\mu\text{l}$ )
<b>Prøveløsning</b>	Fullblodprøver	100
	50 mM fosfatbuffer pH 7,5	130
	Internstandard	20
<b>Akseptorløsning</b>	DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	100
<b>Organisk væskemembran</b>	Undekanon:diheksyleter 1:1 (w/w) + 1 % TOA (w/w)	3
<b>Ekstraksjonstid</b>	60 min (900 rpm)	

### 3.6.3 PALME fra fullblod ved bruk av 96-kanalpipette

Ekstraksjon fra fullblod ble utført ved bruk av en 96-kanalpipette. Før ekstraksjonen ble akseptorløsning og bufferløsning overført til donorplaten ved hjelp av 96-kanalpipetten. En multipipette ble benyttet for å tilsette internstandard og organisk væskemembran. Ekstraksjonsmetoden og ekstraksjonsparametere var i stor grad likt ekstraksjonen fra fullblod uten 96-kanalpipette. Imidlertid ble volumet til akseptorløsning økt til 150  $\mu\text{l}$ , og volumet til



organisk væskemembran ble økt til 4 µl for å tilpasse til oppsettet med 96-kanalpipette og bruk av multipipette.

Etter ekstraksjonen ble 100 µl av hvert ekstrakt overført til en 96-brønnsplate med spisse bunner, ekstraktene ble fortynnet med 100 µl vann ved hjelp av 96-kanalpipetten. Platen ble forseglest og satt på risting i 30 sekunder, slik at løsningene ble blandet godt sammen. Platen ble deretter plassert i autosamleren i LC-MS/MS-instrumentet for analyse. En oppsummering av ekstraksjonsparametere for PALME fra fullblod er vist i **Tabell 3.18**.

**Tabell 3.18: Ekstraksjonsparametere ved bruk av 96-kanalpipette.**

	Betingelser	Volum (µl)
<b>Prøveløsning</b>	Fullblodprøver	100
	50 mM fosfatbuffer pH 7,5	130
	Internstandard	20
<b>Akseptorløsning</b>	DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	150
<b>Organisk væskemembran</b>	Undekanon:diheksyleter 1:1 (w/w) + 1 % TOA (w/w)	4
<b>Ekstraksjonstid</b>	60 min (900 rpm)	

### 3.7 Innledende forsøk

I innledende forsøk ble ekstraksjonsmetoden for basiske upolare substanser optimalisert. Hensikten var å undersøke muligheten for ekstraksjon av stoffene ved bruk av PALME, og hvordan endringer i ekstraksjonsparametere påvirker ekstraksjonseffektiviteten. PALME ble også innledningsvis utført for ekstraksjon av et utvalg benzodiazepiner. Det ble kun ekstrahert vandige prøveløsninger for begge stoffgrupper.

#### 3.7.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere for basiske upolare substanser

Til optimaliseringsforsøket ble det laget en prøveløsning med konsentrasjon 0,5 µg/ml for de basiske upolare substansene. Ulike organiske væskemembraner og ekstraksjonstider ble testet. Den optimale verdien for hver ekstraksjonsparameter ble bestemt basert på prosesseffektivitet. For å regne ut prosesseffektivitet ble det analysert en ren standardløsning med konsentrasjon 2,5 µg/ml for alle analyttene, noe som tilsvarte konsentrasjon i ekstraktene ved 100 % prosesseffektivitet. Beregning av prosesseffektivitet er beskrevet med **Ligning 6** i avsnitt 3.10.1. Ekstraksjonsparametere som ble inkludert i optimaliseringsforsøkene er vist i **Tabell 3.19**.

**Tabell 3.19: Ulike ekstraksjonsbetingelser benyttet i optimaliseringsforsøket.**

	Betingelser	Volum ( $\mu$ l)
<b>Prøveløsning</b>	Standard i 10 mM NaOH	250
<b>Akseptorløsning</b>	20 mM HCOOH	50
<b>Organisk væskemembran</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dodecylacetat + 1 % TOA</li><li>• Diheksyleter + 1 % TOA</li><li>• Undekanon + 1 % TOA</li><li>• Undekanol + 1 % TOA</li><li>• Isopentylbenzen + 1 % TOA</li><li>• Heksadekan + 1 % TOA</li></ul>	3
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 15 min</li><li>• 30 min</li><li>• 45 min</li><li>• 60 min</li><li>• 90 min</li><li>• 120 min</li></ul>	

### Organisk væskemembran

Seks organiske løsemidler ble benyttet basert på tidligere erfaring. Det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller for hvert løsemiddel, med et volum på 3  $\mu$ l. Ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter, med 250  $\mu$ l prøveløsning og 50  $\mu$ l 20 mM HCOOH som akseptorløsning. Optimalisert organisk væskemembran ble bestemt ved å sammenligne oppnådd prosesseffektivitet.

### Ekstraksjonstid

Ved optimalisering av ekstraksjonstid ble den optimaliserte organiske væskemembranen benyttet. Det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller ved seks ekstraksjonstider (**Tabell 3.19**). Prosesseffektiviteten ble beregnet og plottet mot tiden for å lage en tidskurve. Ekstraksjonskinetikken for alle analyttene ble observert og sammenlignet.

### 3.7.2 Ekstraksjon av benzodiazepiner fra vandige prøveløsninger

Etter at PALME av basiske upolare substanser ble undersøkt, ble det bestemt å ekstrahere et utvalg benzodiazepiner og z-hypnotika. Disse analyttene inkluderer 7-aminoklonazepam, klonazepam, nitrazepam, flunitrazepam, oksazepam, alprazolam, N-desmetyldiazepam, fenazepam, diazepam, zolpidem og zopiklon. Analyttene ble ekstrahert med den optimaliserte metoden for ekstraksjon av basiske upolare substanser.

En prøveløsning med konsentrasjon 1 µg/ml for alle analyttene ble laget og ekstrahert. En standardløsning ble i tillegg laget i akseptorløsning til beregning av prosesseffektivitet, med en konsentrasjon på 5 µg/ml som tilsvarte konsentrasjonen til ekstraktene ved 100 % prosesseffektivitet.

### 3.8 Optimalisering av ekstraksjonsparametere

Ved optimalisering av metoden for benzodiazepiner ble ulike ekstraksjonsbetingelser testet, slik som sammensetning av akseptorløsning, organisk væskemembran, pH i prøveløsningen og ekstraksjonstid. Ekstraksjon fra fullblod og plasma ble i tillegg undersøkt. Benzodiazepinene og z-hypnotika som var inkludert i innledende forsøk ble benyttet. Ved optimalisering av ekstraksjonstid og metodevalidering ble analyserepertoaret utvidet med flere designerbenzodiazepiner, og 7-aminoklonazepam ble utelatt.

En prøveløsning med en konsentrasjon på 1 µg/ml for analyttene ble brukt i de fleste optimaliseringsforsøkene. Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for parallellene ble beregnet for å sammenligne ekstraksjonseffektivitet for ulike ekstraksjonsbetingelser.

#### 3.8.1 Akseptorløsning

Basert på tidligere erfaringer ble en akseptorløsning med et volum på 50 µl brukt som utgangspunkt. HCOOH i en rekke konsentrasjoner (10 mM, 20 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM og 1000 mM) ble testet som akseptorløsning. En prøveløsning i 10 mM NaOH med et volum på 250 µl ble tilsatt i hver donorbrønn. Det ble benyttet 3 µl dodecylacetat med 1 % TOA som organisk væskemembran og ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter. Det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller av hver akseptorløsning. Gjennomsnittlig prosesseffektivitet ble beregnet for å bestemme optimal konsentrasjon av HCOOH for ekstraksjonsmetoden.

Akseptorløsninger med ulike sammensetninger ble også undersøkt. DMSO, MeOH, EtOH og ACN er fire av de vanligste organiske løsemidlene som benyttes i laboratoriet og disse ble derfor testet. De organiske løsemidlene og HCOOH ble blandet i ulike forhold og tilsatt i akseptorbrønnen før ekstraksjon. En oversikt av sammensetningene som ble inkludert i optimaliseringsforsøket er vist i **Tabell 3.20**.

**Tabell 3.20: Akseptorløsninger med ulike sammensetninger inkludert i optimaliseringsforsøket.**

DMSO:HCOOH	MeOH:HCOOH	ACN:HCOOH	EtOH:HCOOH
<ul style="list-style-type: none"><li>• 25:75</li><li>• 50:50</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 25:75</li><li>• 50:50</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10:90</li><li>• 20:80</li><li>• 30:70</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 10:90</li><li>• 20:80</li><li>• 30:70</li></ul>

DMSO og MeOH blandet med HCOOH ble først og fremst testet som akseptorløsninger for å undersøke blandingenes innvirkning på prosesseffektivitet. EtOH og ACN blandet med HCOOH ble benyttet i ettertid for å sammenligne med den optimaliserte sammensetningen.

### 3.8.2 Organisk væskemembran

Syv ulike organiske løsemidler som inkluderer bis(2-etylheksyl)fosfit (DEHPi), diheksyleter, dodecylacetat, heksadekan, isopentylbenzen, undekanol og undekanon ble utvalgt til optimalisering av organisk væskemembran. Det ble pipettert 3 µl av organisk løsemiddel med 1 % TOA på filteret for hver brønn. Det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller for hvert organisk løsemiddel, med 250 µl prøveløsning laget i 10 mM NaOH i donorbrønnen. Ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter. Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for hvert organisk løsemiddel ble beregnet for å bestemme optimal organisk væskemembran.

### 3.8.3 Prøveløsning

Ved optimalisering av pH i prøveløsning, ble det laget tre prøveløsninger med ulik pH:

- Prøveløsning i 10 mM NaOH med pH 12,0
- Prøveløsning i 0,1 mM karbonatbuffer med pH 9,5
- Prøveløsning i 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5

Bufferløsningene som ble benyttet var tilgjengelige fra Farmasøytisk institutt. Det ble tilsatt 250 µl av prøveløsningene i hver donorbrønn og det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller av hver løsning i 45 minutter. Optimal pH i prøveløsningen ble bestemt ut fra prosesseffektiviteten for disse tre løsningene.

Ettersom viktige ekstraksjonsparametere for ekstraksjon fra vandige prøveløsninger ble optimalisert, ble ekstraksjon fra plasma og fullblod også undersøkt. Det ble benyttet tre ulike betingelser i donorbrønn:

- 100 µl blod blandet med 150 µl buffer
- 100 µl plasma blandet med 150 µl buffer
- 250 µl vandig prøveløsning laget i buffer

Ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter, og prosesseffektiviteten for de tre prøvene ble sammenlignet.

#### 3.8.4 Ekstraksjonstid

Det ble utført ekstraksjon fra fire paralleller for ekstraksjonstidene 5, 15, 30, 60, 120 og 180 minutter. De optimale ekstraksjonsbetingelsene som ble bestemt under optimaliseringsforsøkene ble benyttet. Prosesseffektiviteten ble plottet som funksjon av ekstraksjonstid for å lage en tidskurve. Ekstraksjonskinetikken for samtlige analytter ble observert og sammenlignet for å bestemme optimal ekstraksjonstid.

#### 3.8.5 Automatisering

Den optimaliserte ekstraksjonsmetoden ble delvis automatisert ved å benytte en manuell 96-kanalpipette for pipettering av væskeløsninger som akseptorløsning og bufferløsning. Det ble utført ekstraksjon fra to paralleller av standarder og to paralleller av kontroller. PALME-oppsettet ble satt på risting på samme måte som før. Etter ekstraksjonen ble ekstraktene overført til en 96-brønnsplate med spisse bunner i stedet for vialer. Platen kunne plasseres direkte i autosampleren i UHPLC-MS/MS-instrumentet for analyse. Enkelte parametere ble justert underveis for å tilpasse til det delvis automatiserte oppsettet med 96-kanalpipette.

### 3.9 Metodevalidering

Den optimaliserte metoden for ekstraksjon av benzodiazepiner ble validert etter retningslinjene for bioanalytisk metodevalidering fra EMA. Det ble utført validering av linearitet, presisjon og nøyaktighet, minste detekterbare konsentrasjon (*limit of detection*, LOD), minste kvantifiserbare konsentrasjon (*limit of quantification*, LOQ), ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, spesifisitet, overdrag og stabilitet. I innledende forsøk ble ekstraksjonsmetoden for diverse basiske upolare substanser i vandige prøveløsninger også optimalisert. Innenfor omfanget av denne masteroppgaven var det ikke rom for å validere også denne metoden.

### 3.9.1 Linearitet

Linearitet ble bestemt på ti konsentrasjonsnivåer ved å analysere to serier standarder og kontroller etter hverandre. Hver serie bestod av tre paralleller for hvert konsentrasjonsnivå. Det ble laget lineære kalibreringskurver med  $1/x$  vektning for hver analytt ved bruk av TargetLynx™. Linearitet ble vurdert ved å beregne korrelasjonskoeffisienten  $R^2$  for kurvene.  $R^2 \geq 0,99$  indikerer at konsentrasjon er godt korrelert til signalintensiteten.

### 3.9.2 Nøyaktighet og presisjon

Nøyaktighet og presisjon ble bestemt på fire konsentrasjonsnivåer (kontroll 1-4). Presisjonen innen serie ble undersøkt ved å analysere ti paralleller for hvert konsentrasjonsnivå. For validering av presisjon mellom serie ble analyse av tre paralleller for hvert konsentrasjonsnivå utført over åtte dager. Tre paralleller av standarder (standard 1-6) ble også ekstrahert til samme tid for å lage en kalibreringskurve for hver analytt.

Ved databehandling ble konsentrasjonene til samtlige analytter beregnet mot kalibreringskurvene. Presisjonen ble bestemt ved at konsentrasjonens gjennomsnitt og relativ standardavvik (RSD) ble beregnet og sammenlignet med kravet i retningslinjene. Nøyaktighet uttrykt som relativ feil ble bestemt samtidig ved å beregne prosentavvik fra teoretisk konsentrasjon. Beregning av nøyaktighet er beskrevet med **Ligning 7** i avsnitt 3.10.2.

### 3.9.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon

Minste kvantifiserbare konsentrasjon (*limit of quantification*, LOQ) ble bestemt ved validering av presisjon og nøyaktighet. Den laveste undersøkte konsentrasjonen med RSD-verdi og relativ feil innenfor grensene for presisjon og nøyaktighet ble satt til LOQ.

### 3.9.4 Minste detekterbare konsentrasjon

Minste detekterbare konsentrasjon (*limit of detection*, LOD) ble bestemt ved å fortynne laveste standard to ganger, fem ganger, ti ganger og 20 ganger. Fortynnede løsninger ble ekstrahert på samme måte som andre standarder og kontroller. Laveste konsentrasjon som ga et signal-til-støy-forhold lik 3 eller høyere ble identifisert.

### 3.9.5 Ekstraksjonsutbytte og matrikseffekter

Validering av matrikseffekter ble utført i henhold til Matuszewskis metode og ble bestemt samtidig med ekstraksjonsutbytte på fire konsentrasjonsnivåer [7].

Det ble laget tre sett av løsninger. I sett 1) ble seks serier kontroller (kontroll 1-4) benyttet. Hver serie ble laget i forskjellige batcher fullblod og ekstrahert. I sett 2) ble fire blanke blodprøver ekstrahert for hver av de seks batchene fullblod som ble benyttet. Analytter ble tilsatt i blanke ekstrakter etter ekstraksjon, slik at det ble laget en serie for hvert fullblod, og som tilsvarte ekstraktene i sett 1) ved 100 % utbytte. Sett 3) bestod av to paralleller av analytter løst i ren akseptorløsning for hvert konsentrasjonsnivå. Konsentrasjon av analytter i løsningene tilsvarte konsentrasjonene i sett 2), men var uten ekstraksjon og innvirkning fra fullblod. Internstandarder ble tilsatt etter ekstraksjon i alle ekstraktene og løsningene.

Ekstraksjonsutbyttet til analyttene ble beregnet for hvert konsentrasjonsnivå som prosentforhold mellom respons fra analytt tilsatt før ekstraksjon i sett 1) og respons fra analytt tilsatt etter ekstraksjon i sett 2). Matrikseffekter ble beregnet for hvert fullblod som prosentforhold mellom respons fra analytt i sett 2) og respons fra analytt i ren akseptorløsning i sett 3). Beregningsformlene for ekstraksjonsutbytte og matrikseffekter er beskrevet med henholdsvis **Ligning 8** og **Ligning 9** i avsnitt 3.10. Matrikseffektene ble i tillegg beregnet relativt til internstandard.

### 3.9.6 Spesifisitet

Spesifisitetstesten ble utført ved å ekstrahere én parallell av ni standardløsninger med til sammen 159 forbindelser. Retensjonstid og signalintensitet for topper med like overganger som analyttene ble vurdert.

### 3.9.7 Overdrag

Overdrag ble bestemt ved å fortynne arbeidsløsningen til lavdoserte benzodiazepiner, høydoserte benzodiazepiner og z-hypnotika hver for seg i vann, slik at den endelige konsentrasjonen ble 25 ganger høyere enn konsentrasjon av høyeste standard. Tre blanke blodprøver ble ekstrahert. Ekstraktene ble injisert etter kjøring av hver konsentrert løsning. Signalintensitetene ble målt og sammenlignet med signalintensitetene fra LOQ.

### 3.9.8 Stabilitet

En serie ble analysert og oppbevart i autosampleren ved 10°C i fire dager før reanalyse. Reanalyse etter én uke i fryser ved -20°C ble også testet. Avvik til konsentrasjon av analytter fra opprinnelig målt konsentrasjon ble beregnet i prosent.

## 3.10 Beregninger og formler

### 3.10.1 Prosesseffektivitet

Ved ekstraksjon av analytt i prøveløsning ble prosesseffektivitet (PE) bestemt ved å beregne prosentforhold mellom respons fra analytt i ekstrakt og respons fra analytt tilsatt i vandig akseptorløsning uten ekstraksjon med følgende formel:

**Ligning 6:** 
$$PE = \frac{\text{Respons fra analytt i ekstrakt}}{\text{Respons fra analytt tilsatt i ren løsning}} \cdot 100 \%$$

### 3.10.2 Nøyaktighet

Nøyaktighet uttrykt som relativ feil ble beregnet som prosentavvik mellom målt konsentrasjon ( $C_{\text{obs}}$ ) og teoretisk konsentrasjon ( $C_t$ ) med følgende formel:

**Ligning 7:** 
$$\text{Relativ feil} = \frac{C_{\text{obs}} - C_t}{C_t} \cdot 100 \%$$

### 3.10.3 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbytte (RE) ble bestemt ved å beregne prosentforhold mellom respons fra analytt tilsatt i prøveløsning før ekstraksjon og respons fra analytt tilsatt i blankt ekstrakt etter ekstraksjon med følgende formel:

**Ligning 8:** 
$$RE = \frac{\text{Respons fra analytt tilsatt før ekstraksjon}}{\text{Respons fra analytt tilsatt etter ekstraksjon}} \cdot 100 \%$$



### 3.10.4 Matrikseffekter

Matrikseffekter (ME) ble bestemt ved å beregne prosentforhold mellom respons fra analytt tilsatt etter ekstraksjon i blankt ekstrakt og respons fra analytt tilsatt i vandig akseptorløsning uten ekstraksjon med følgende formel:

**Ligning 9:** 
$$ME = \frac{\text{Respons fra analytt tilsatt etter ekstraksjon}}{\text{Respons fra analytt i ren løsning}} \cdot 100 \%$$

## 4 Resultat og diskusjon

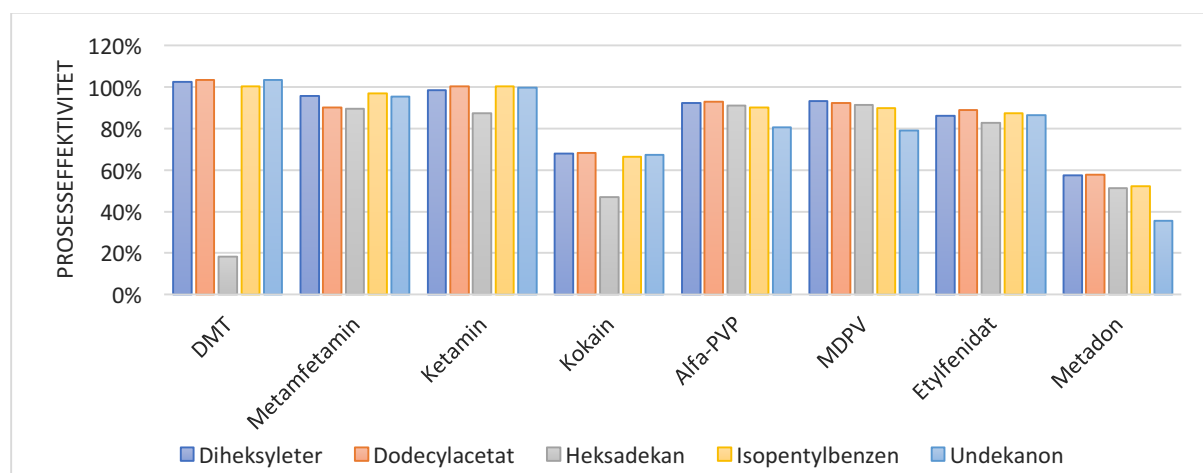
### 4.1 Innledende forsøk

I innledende forsøk ble det utført optimalisering av ekstraksjonsmetoden for basiske upolare substanser i vandige prøveløsninger. Hensikten med dette var som nevnt å undersøke muligheten for ekstraksjon av basiske upolare substanser ved bruk av pH-gradienten i PALME-systemet. Den optimaliserte metoden ble deretter benyttet som et utgangspunkt for ekstraksjon av benzodiazepiner.

#### 4.1.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere for basiske upolare substanser

##### Organisk væskemembran

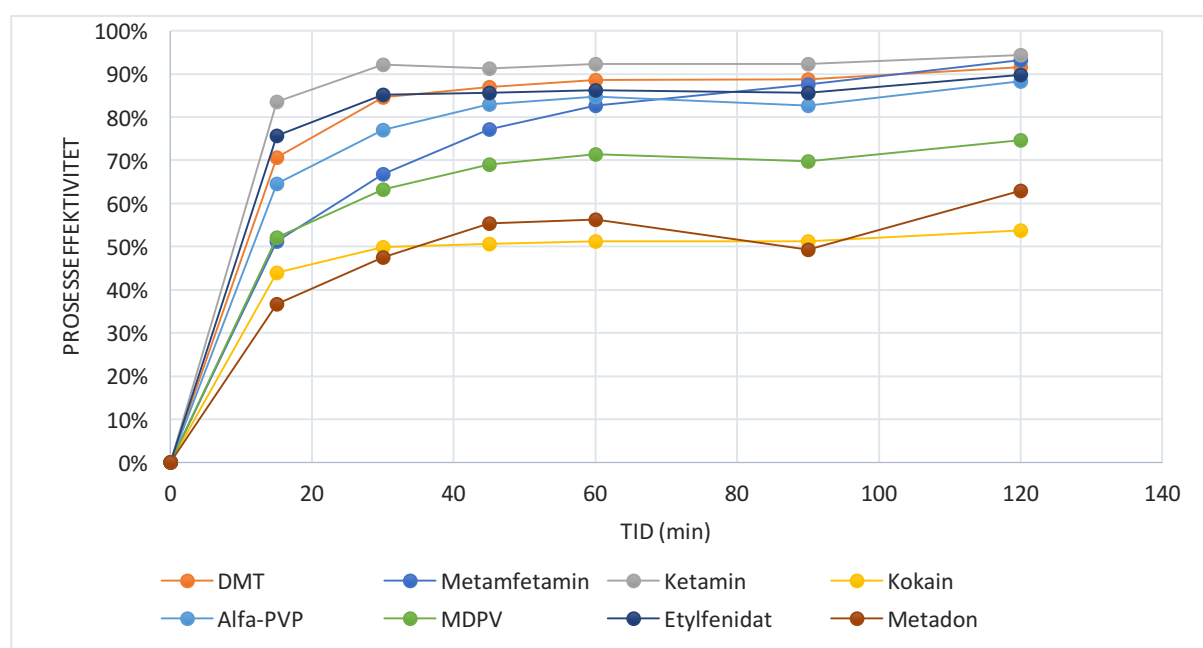
Seks ulike organiske løsemidler som var tilsatt 1 % TOA ble benyttet for optimalisering av organisk væskemembran. Under ekstraksjonen ble det emulgering i ekstraktene ved bruk av undekanol. Dette løsemiddelet var dermed ikke egnet som væskemembran. Prosesseffektivitet for ulike organisk løsemidler er vist i **Figur 9**. Heksadekan og undekanon ga lavere prosesseffektivitet for enkelte stoffer, mens det var lite forskjell mellom diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbenzen. Dodecylacetat ga prosesseffektivitet mellom 58-103 % og ble valgt for videre optimalisering i ekstraksjonssystemet.



**Figur 9: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for ulike organiske løsemidler med 1 % TOA.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250  $\mu$ l prøveløsning (0,5  $\mu$ g/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l organisk løsemiddel med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 50  $\mu$ l 20 mM HCOOH. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

## Ekstraksjonstid

Det ble laget en tidsskurve hvor prosesseffektivitetene ble plottet som funksjon av ekstraksjonstid (**Figur 10**). Ekstraksjonskinetikken var rask for de fleste analyttene opp til 30-45 minutter, hvor prosesseffektiviteten stabiliserte seg. For kokain var kinetikken noe tregere. Et annet unntak var prosesseffektiviteten for metamfetamin som økte i takt med ekstraksjonstiden helt til siste målepunkt ved 120 minutter. 120-minutterspunktet ga den høyeste prosesseffektiviteten for alle stoffene. Ekstraksjonstiden ble fastsatt til 45 minutter for effektiv analyse siden prosesseffektiviteten ikke økes vesentlig etter dette tidspunktet for de fleste analyttene.



**Figur 10: Tidsskurven av basiske upolare substanser.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250  $\mu$ l prøveløsning (0,5  $\mu$ g/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l dodecylacetat med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 50  $\mu$ l 20 mM HCOOH. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

## Stabilitet

Under optimalisering av ekstraksjonsmetoden fikk noen analytter svært lav prosesseffektivitet ved bruk av ferdiglagde arbeidsløsninger. Stabilitet av analyttene ble følgelig undersøkt. En standardløsning laget i 10 mM NaOH ble først analysert rett etter at løsningen ble laget, og deretter reanalysert etter 21 timer. Topparealene i kromatogrammene fra begge analysene ble sammenlignet. Det viste seg at kokain og etylfenidat ble påvirket i større grad enn de andre analyttene. Dette kan skyldes at disse to forbindelsene er estere, som kan hydrolysere i både surt og basisk miljø.

## Oppsummering

Det viste seg at ekstraksjonsmetoden samlet sett ga best prosesseffektivitet ved å bruke dodecylacetat med 1 % TOA som organisk væskemembran, og en ekstraksjonstid på 45 minutter. Betingelsene for den optimaliserte metoden er oppsummert i **Tabell 4.1**. Som forventet fikk substansene god prosesseffektivitet ved bruk av PALME på grunn av deres basiske og upolare egenskaper. Med disse egenskapene kunne analyttene fordeles i organisk væske membran i nøytral form, og løse seg i sur akseptorløsning i ladet form. Imidlertid var stabilitet en utfordring for analyttene som er følsomme for sterke baser og syrer. For ekstrakter som skal oppbevares for senere analyse bør dermed stabilitet av disse stoffene vurderes. Standardløsningen som brukes til beregning av prosesseffektivitet skal også benyttes samme dag som den blir laget.

**Tabell 4.1: Ekstraksjonsparametere for den endelige ekstraksjonsmetoden.**

	Betingelser	Volum ( $\mu$ l)
<b>Donorløsning</b>	Standard i 10 mM NaOH	250
<b>Akseptorløsning</b>	20 mM HCOOH	50
<b>Organisk væskemembran</b>	Dodecylacetat + 1 % TOA	3
<b>Ekstraksjonstid</b>	45 min (900 rpm)	

### 4.1.2 Ekstraksjon av benzodiazepiner fra vandige prøveløsninger

Ettersom den optimaliserte metoden for ekstraksjon av basiske upolare substanser ga tilfredsstillende resultat, ble det besluttet å undersøke PALME av substanser med andre egenskaper. I denne oppgaven anvendes PALME for første gang til prøveoppbehandling for benzodiazepiner. I motsetning til basiske upolare substanser har benzodiazepiner generelt lav basisk pKa-verdi, og er vanskeligere å protonere i et surt miljø. I PALME-systemet vil derfor den lave pKa-verdien vanskeliggjøre transport av benzodiazepiner gjennom den organiske væskemembranen ved hjelp av pH-gradienten. Dette ble undersøkt ved at et utvalg benzodiazepiner ble ekstrahert med den optimaliserte ekstraksjonsmetoden for basiske og upolare substanser.

Resultatet viste at benzodiazepinene fikk generelt lav prosesseffektivitet som var mellom 0 % og 27 %. Dette kan skyldes den lave basiske pKa-verdien som hindret analyttene i å gå over til protonert form, noe som gjør at de ikke løste seg i vandig akseptorløsning. Analyttene kan dermed sitte igjen i den organiske væskemembranen. Dette ble ikke testet ettersom flere ekstraksjonsparametere kunne blitt optimalisert. Zolpidem har høyere pKa-verdi (5,39) og fikk

høyest prosesseffektivitet. Zopiklon har en pKa-verdi på 6,86, noe som burde være en fordel for prosesseffektiviteten, men analytten ga ingen respons i kromatogrammet. For å undersøke dette ble kromatogrammet til en ren standardløsning med samtlige analytter analysert, hvor respons fra zopiklon heller ikke ble funnet. Dette ble ikke undersøkt videre og det ble satt fokus på optimalisering av ekstraksjonsmetoden for benzodiazepiner.

## 4.2 Optimalisering av ekstraksjonsparametere

Det er to kritiske trinn i ekstraksjonsprosessen ved PALME: transport av analytter fra prøveløsning til organisk væskemembran, og transport av analytter fra organisk væskemembran til vandig akseptorløsning. Ettersom benzodiazepiner generelt har høy log P-verdi og kan ha god løselighet i organisk væskemembran ble optimalisering av analyttenes løselighet i akseptorløsning ansett som mer avgjørende for økning av prosesseffektiviteten. Endringer i akseptorløsningen, som for eksempel økning av HCOOH-konsentrasjonen, tilsetning av MeOH og DMSO i ulike konsentrasjoner, ble derfor først testet.

Endring i både organisk væskemembran og prøveløsning ble deretter undersøkt for å øke analyttenes løselighet i væskemembranen. Dette ble utført ved å teste ulike organiske løsemidler som organisk væskemembran, og ekstrahere prøveløsninger med ulik pH. Ekstraksjon med plasma og fullblod som analysemedium ble også undersøkt.

For å utvikle en metode med effektiv analyse ble ekstraksjonsmetoden delvis automatisert ved bruk av en 96-kanalpipette. Elueringsgradienten i LC-MS/MS ble også justert for å korte ned analysetiden for analyttene under optimalisering av ekstraksjonsparameterne.

### 4.2.1 Akseptorløsning

#### **Økt konsentrasjon av HCOOH**

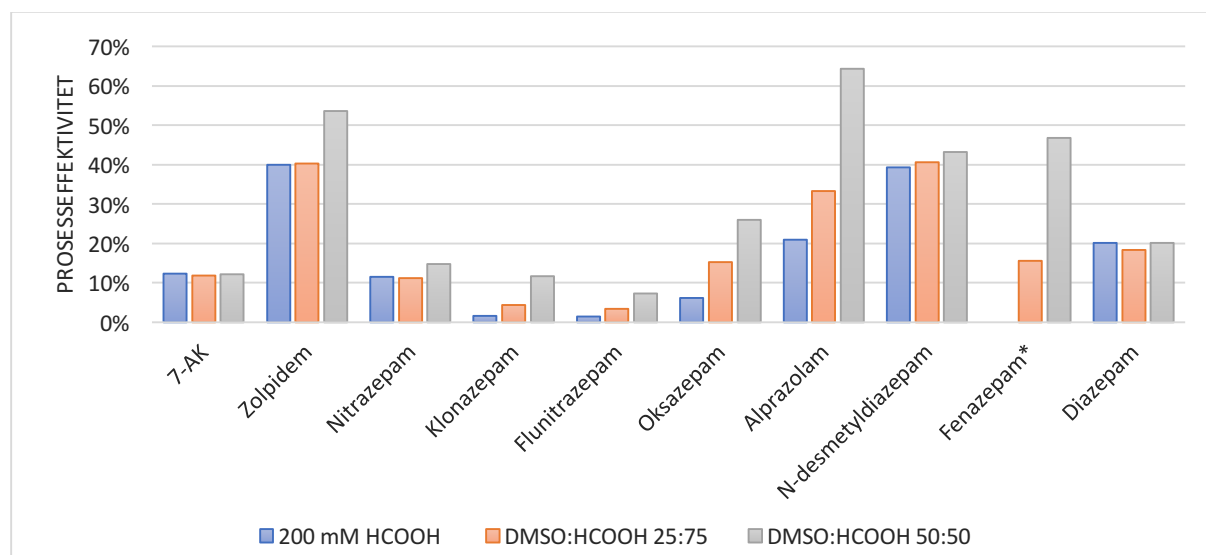
En mulighet for å øke prosesseffektiviteten var å skyve likevekten av analyttene mot protonert form i vandig fase. Dette ble gjort ved å øke konsentrasjonen av HCOOH. I forsøket ble HCOOH med konsentrasjonene 10 mM, 20 mM, 100 mM, 200 mM, 500 mM, og 1000 mM benyttet som akseptorløsning. En svak økning i prosesseffektiviteten ble observert for flere analytter, og en større økning ble sett for nitrazepam. Samtidig ble prosesseffektiviteten redusert for 7-aminoklonazepam, zolpidem og alprazolam. Av ukjent grunn fikk nitrazepam i ekstraktene mye sterkere signal enn i standardløsningen, med en beregnet prosesseffektivitet

på over 190 %. Forsøket ble ikke gjentatt for å undersøke dette, og det ble heller valgt å gå videre med flere løsemidler i akseptorløsningen. Ettersom det totalt sett var en økning i prosesseffektiviteten ved økende konsentrasjon, ble det valgt et kompromiss med en konsentrasjon på 200 mM HCOOH til videre optimalisering, som erstatning for den tidligere brukte konsentrasjonen på 20 mM HCOOH.

### DMSO i akseptorløsning

Siden økt konsentrasjon av HCOOH ikke ga vesentlig økning i prosesseffektivitet, ble tilsetning av organisk løsemiddel i akseptorløsning undersøkt. Hensikten var å gjøre akseptorløsningen mindre polar og gi bedre løselighet for analyttene i akseptorløsningen. DMSO og MeOH blandet med 200 mM HCOOH hver for seg i forholdet 25:75 og 50:50 (v/v) ble sammenlignet med 200 mM HCOOH som akseptorløsning. Det ble dannet emulsjon i ekstraktene som inneholdt MeOH, og ekstraktene ble ikke tatt med til analyse.

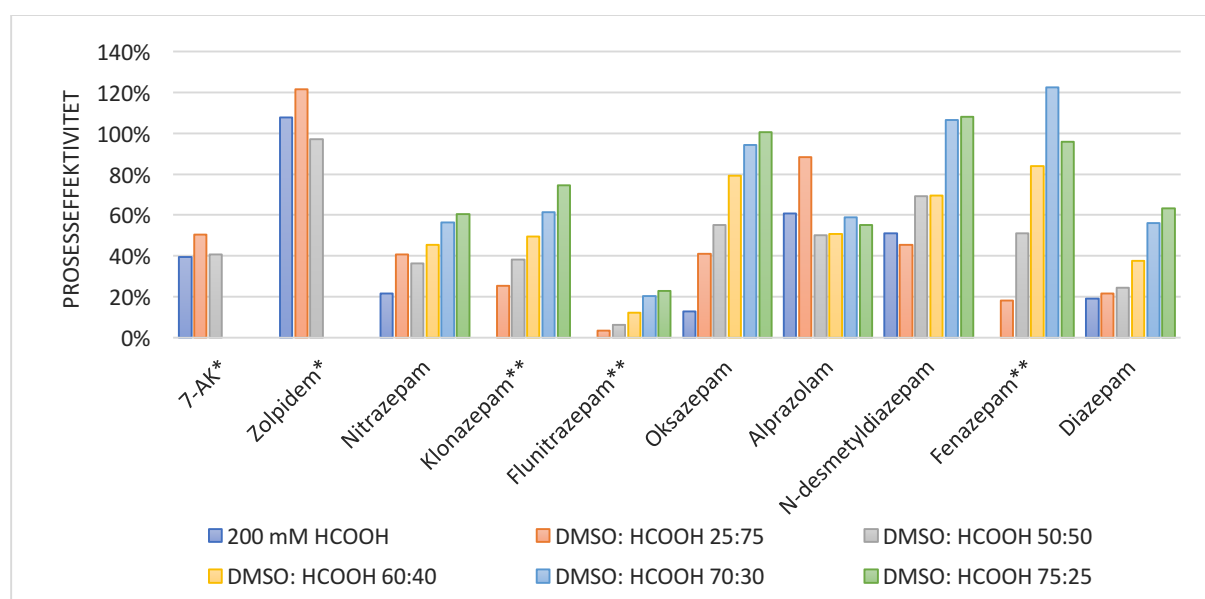
Resultatet viste at akseptorløsninger med DMSO tilsatt HCOOH i forholdet 50:50 ga en generell økning i prosesseffektivitet i forhold til ren HCOOH, som vist i **Figur 11**. Dette gjaldt særlig for zolpidem, oksazepam, alprazolam og fenazepam. Den økte prosesseffektiviteten skyldtes antagelig økt løselighet av analyttene i en mer upolar akseptorløsning.



**Figur 11: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet med DMSO i akseptorløsning.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbørrn: 250  $\mu$ l prøveløsning (1  $\mu$ g/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l dodecylacetat med 1 % TOA. Akseptorbørrn: 50  $\mu$ l akseptorløsning. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)  
\*Manglende søyle for 200 mM HCOOH pga. 0 % prosesseffektivitet.

Ettersom en vesentlig forbedring i prosesseffektivitet ble funnet med denne endringen av akseptorfasen, ble muligheten for å øke analyttens løselighet i organisk væskemembran testet for videre optimalisering av akseptorløsningen. Dette er beskrevet nærmere i avsnitt 4.2.2.

Muligheten for ytterligere økning i prosesseffektivitet ved økende andel DMSO i akseptorløsningen ble deretter undersøkt. DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 25:75, 50:50, 60:40, 70:30 og 75:25 ble testet som akseptorløsning. Til beregning av prosesseffektivitet ble det laget en standardløsning med tilsvarende sammensetning for hver akseptorløsning for å få mest mulig nøyaktig resultat. Resultatet er vist i **Figur 12**.



**Figur 12: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet med økende mengde DMSO i akseptorløsning.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250  $\mu$ l prøveløsning (1  $\mu$ g/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l undekanon:pentylbenzen 1:1 med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 50  $\mu$ l akseptorløsning. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

\*Prosesseffektivitetene til 7-aminoklonazepam og zolpidem ble ikke beregnet for enkelte akseptorløsninger grunnet dårlig kromatogram ved større mengde av DMSO tilsatt i akseptorløsning.

\*\*Manglende søyle for 200 mM HCOOH pga. 0 % prosesseffektivitet.

Som **Figur 12** viser økte prosesseffektiviteten betydelig for de fleste analyttene når man sammenligner prosesseffektivitet for DMSO tilsatt i HCOOH i forholdet 75:25 med ren 200 mM HCOOH. Økningen var særlig stor for fenazepam, oksazepam og klonazepam. Unntaket var alprazolam som ikke fikk økning i prosesseffektivitet. Dette skyldtes muligens at analytten har høyere basisk pKa-verdi, slik at i syre er analytten relativt polar. Ved tilsetning av DMSO ble akseptorløsningen mindre vandig, og alprazolam kunne få lavere løselighet i akseptorløsningen.

Ved større mengde DMSO tilsatt i akseptorløsningen var det ikke mulighet for beregning av prosesseffektivitet for 7-aminoklonazepam og zolpidem grunnet dårlig kromatogram. Toppene var brede og ble ikke separert fra hverandre. Dette ble også sett i kromatogrammet for tilsvarende standardløsning. Ved bruk av UV-detektor var det da ikke mulig å kvantifisere dem. Årsaken var antagelig at den store mengden DMSO i den injiserte prøven førte til at analyttene ikke rakk å retardere i stasjonærfasen. Dette ble undersøkt i videre avsnitt hvor fortykning av DMSO-ekstraktene ble testet.

Siden konsentrasjon av HCOOH ble fortyknet ved tilsetning av DMSO, ble det undersøkt hvorvidt prosesseffektiviteten ble påvirket av fortykningen. Det ble laget en akseptorløsning med DMSO tilsatt i 400 mM HCOOH i forholdet 50:50 for å sammenligne med DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 50:50. Resultatet viste at differansen mellom prosesseffektivitetene for akseptorløsningene var liten, noe som tilsa at konsentrasjon av HCOOH hadde lite påvirkning på prosesseffektiviteten. Videre arbeid ble følgelig utført med DMSO blandet med 200 mM HCOOH i forholdet 75:25.

### **Ren DMSO som akseptorløsning**

Etttersom økt mengde DMSO i akseptorløsningen ga økt prosesseffektivitet, ble ren DMSO og sur DMSO undersøkt som akseptorløsning. Sur DMSO ble laget ved å fortykke konsentrert HCOOH i ren DMSO, slik at den endelige konsentrasjonen av HCOOH ble 200 mM. Akseptorløsningene ble sammenlignet med DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 75:25. Resultatet viste at ren DMSO og sur DMSO ga lavere prosesseffektivitet i forhold til blandingen av DMSO og HCOOH. Den ene parallellen til prøvene ekstrahert med ren DMSO fikk for lite ekstrakt i akseptorbrønnen etter ekstraksjon. Dette skyldtes muligens et stort innhold av organisk løsemiddel i akseptorløsningen som økte løselighet av organisk væskemembran i akseptorløsningen, eller lekkasje i selve filteret. Det ble besluttet at ren DMSO og sur DMSO ikke var egnet som akseptorløsning.

### **EtOH og ACN i akseptorløsning**

I tillegg til MeOH er ACN og EtOH to andre vanlige organiske løsemidler som benyttes i laboratoriet. Selv om det viste seg at DMSO tilsatt i HCOOH ga stor økning i prosesseffektivitet, ble EtOH og ACN tilsatt i HCOOH også testet som akseptorløsning for å sammenligne med DMSO tilsatt i HCOOH i forholdet 75:25.



Under ekstraksjonen oppstod lekkasje av organisk væskemembran ved bruk av ACN tilsatt i HCOOH i forholdet 30:90, slik at volumene av ekstraktene var mindre enn andre ekstrakter. Det indikerte at løsningen ikke var egnet som akseptorløsning. Resultatet viste i tillegg at tilsetning av ACN og EtOH i akseptorløsning hadde svært liten effekt i forbedring av prosesseffektivitet sammenlignet med DMSO tilsatt i HCOOH i forholdet 75:25, noe som tilsa at blandingen med DMSO og HCOOH var en mer optimal akseptorløsning.

### **Fortynning av DMSO i ekstrakt**

Med hensyn til brede, ikke-separerte topper som zolpidem og 7-aminoklonazepam fikk i kromatogrammet under optimaliseringen av akseptorløsning, ble fortynning av DMSO i ekstraktet med 200 mM HCOOH testet. Hensikten med dette var at ved fortynningen ble det mindre andel DMSO i ekstraktet, slik at ved injeksjon av ekstraktet til kolonnen ble det også mindre andel DMSO i den injiserte prøven, noe som kunne gi bedre retensjon for gjeldende analytter og følgelig et bedre kromatogram. I forsøket ble 25 µl av ekstraktet overført til vialer etter ekstraksjon, og fortynnet med 200 mM HCOOH henholdsvis i forholdet 1:1, 1:2, 1:3 og 1:4 (v/v). Toppene ble sammenlignet visuelt i databehandlingsprogrammet, og ved å beregne prosesseffektivitet. Resultatet viste at fortynningen av ekstraktene med 200 mM HCOOH i forholdet 1:1 var tilstrekkelig for at toppene ble separert.

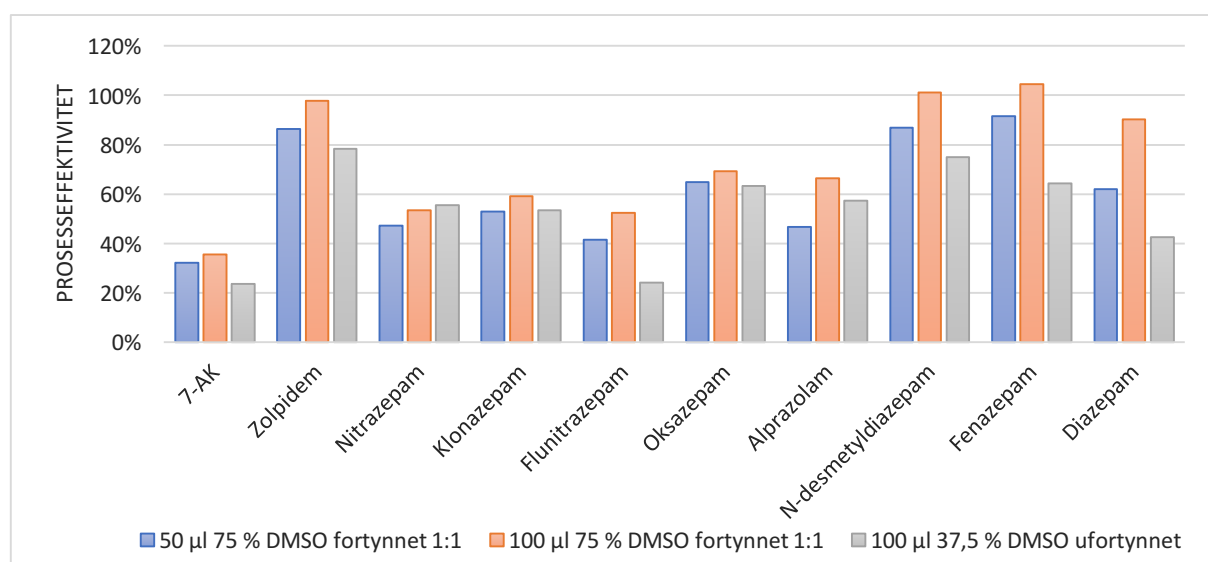
Det var arbeidskrevende å fortynne ekstraktene med tanke på å blande løsningene i en smal insert i vial ved hjelp av en pipette, spesielt ved ekstraksjon av flere prøver. Dersom økning i ekstraksjonsbytte var avhengig av mengde til DMSO i akseptorløsning og ikke andel av DMSO i akseptorløsning, ville det være mulig å fortynne DMSO i akseptorløsning før ekstraksjon, slik at fortynning etter ekstraksjon ikke var påkrevd. For å undersøke om det var mengde av DMSO i akseptorløsning eller andel av DMSO i akseptorløsning som var avgjørende for økning i prosesseffektivitet, ble prøvene ekstrahert med tre forskjellige betingelser i akseptorløsning:

- Akseptorløsning 1:  
50 µl DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 fortynnet 1:1 etter ekstraksjon (tilsvarer 75 % DMSO i ekstrakt, og 37,5 % DMSO etter fortynning)
- Akseptorløsning 2:  
100 µl DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 fortynnet 1:1 etter ekstraksjon (tilsvarer 75 % DMSO i ekstrakt, og 37,5 % DMSO etter fortynning)

- Akseptorløsning 3:

50 µl DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 fortynnet 1:1 før ekstraksjon (tilsvarer 37,5 % DMSO i ekstrakt)

Resultatet er presentert i **Figur 13**. Sammenligning mellom akseptorløsning 1 og 3 viste at selv ved like mengder av DMSO i ekstraktet ga akseptorløsningen med høyere andel av DMSO stort sett høyere prosesseffektivitet. Økning i prosesseffektivitet var dermed ikke avhengig av mengden til DMSO men andelen av DMSO. Akseptorløsning 1 og 2 burde ha gitt like prosesseffektiviteter med tanke på like andeler av DMSO, men akseptorløsning 2 fikk høyere prosesseffektivitet på grunn av større volum i akseptorbrønnen. Det ble konkludert med at det likevel var nødvendig å fortynne ekstraktene etter ekstraksjon, og at volumet til akseptorløsning ble økt til 100 µl til videre optimalisering siden volumet ga høyere prosesseffektivitet.



**Figur 13: Prosesseffektivitet ved fortynning av DMSO i akseptorløsning før og etter ekstraksjon.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250 µl prøveløsning (1 µg/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3 µl undekanon:diheksyleter 1:1 med 1 % TOA. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

Under optimalisering av ekstraksjonstiden ble vann benyttet til fortynning av ekstrakt istedenfor 200 mM HCOOH. Med tanke på at vann var mer brukervennlig, og at resultatet ikke ble påvirket av endringen, ble det bestemt å benytte vann til fortynning av ekstrakt i videre forsøk.

## 4.2.2 Organisk væskemembran

### Rene organiske løsemidler som væskemembran

Optimalisering av organisk væskemembran ble utført ved bruk av akseptorløsningen med DMSO tilsatt i 200 mM HCOOH i forholdet 50:50. Syv ulike organiske løsemidler ble testet som væskemembran og ga varierende prosesseffektivitet. Blant løsemidlene var det undekanon, diheksyleter, isopentylbenzen og DEHPi som skilte seg ut. Prosesseffektiviteten for løsemidlene er presentert i **Tabell 4.2**.

**Tabell 4.2: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for rene organiske løsemidler.**

	Undekanon	Diheksyleter	Isopentylbenzen	DEHPi
<b>7-AK</b>	58 %	6 %	3 %	71 %
<b>Alprazolam</b>	42 %	10 %	32 %	43 %
<b>Diazepam</b>	14 %	43 %	141 %	14 %
<b>Fenazepam</b>	32 %	71 %	55 %	9 %
<b>Flunitrazepam</b>	5 %	9 %	8 %	4 %
<b>Klonazepam</b>	37 %	49 %	6 %	11 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	34 %	66 %	47 %	10 %
<b>Nitrazepam</b>	37 %	46 %	5 %	13 %
<b>Oksazepam</b>	39 %	48 %	7 %	16 %
<b>Zolpidem</b>	84 %	29 %	84 %	12 %

*Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250 µl prøveløsning (1 µg/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3 µl organisk løsemiddel med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 50 µl DMSO:200 mM HCOOH 50:50. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)*

Undekanon og diheksyleter ga generelt tilfredsstillende prosesseffektivitet for de fleste analyttene med noen unntak som 7-aminoklonazepam, alprazolam og diazepam. Isopentylbenzen ga spesielt høyt prosesseffektivitet for diazepam, og DEHPi ga høyest prosesseffektivitet for de mest polare analyttene som 7-aminoklonazepam og alprazolam. Imidlertid var det ingen løsemidler som ga vesentlig økning i prosesseffektiviteten til flunitrazepam.

Konklusjonen er at det var ingen av de rene organiske løsemidlene som var optimale for samtlige analytter, og siden forskjellige løsemidler var best for forskjellige stoffer ble det videre undersøkt om blandinger av løsemidlene kunne gi en synergieffekt.

## Blanding av organiske løsemidler som væskemembran

Det ble bestemt å lage blanding av to organiske løsemidler i forholdet 1:1 (w/w) med 1 % TOA.

I dette forsøket ble fire blandinger laget og benyttet som organisk væskemembran:

- Undekanon og diheksyleter med 1 % TOA
- Undekanon og isopentylbenzen med 1 % TOA
- Diheksyleter og isopentylbenzen med 1 % TOA
- Diheksyleter og DEHPi med 1 % TOA.

Gjennomsnittlig prosesseffektivitet ble beregnet for hver blanding, og ble sammenlignet med prosesseffektivitetene for de enkelte løsemidler. Resultatet er oppsummert i **Tabell 4.3**.

**Tabell 4.3: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for ulike blandinger av organiske løsemidler.**

	Undekanon/ Diheksyleter	Undekanon/ Isopentylbenzen	Diheksyleter/ Isopentylbenzen	Diheksyleter/ DEHPi
<b>7-AK</b>	28 %	30 %	6 %	62 %
<b>Alprazolam</b>	40 %	44 %	21 %	40 %
<b>Diazepam</b>	28 %	52 %	79 %	22 %
<b>Fenazepam</b>	57 %	51 %	73 %	20 %
<b>Flunitrazepam</b>	8 %	7 %	9 %	7 %
<b>Klonazepam</b>	42 %	29 %	43 %	26 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	54 %	49 %	68 %	20 %
<b>Nitrazepam</b>	41 %	27 %	40 %	26 %
<b>Oksazepam</b>	48 %	38 %	45 %	30 %
<b>Zolpidem</b>	70 %	86 %	54 %	64 %

*Ekstraksjonsbetingelser: donorbønn: 250 µl prøveløsning (1 µg/ml) i 10 mM NaOH. Organisk væskemembran: 3 µl blanding av organiske løsemidler med 1 % TOA. Akseptorbønn: 50 µl DMSO:200 mM HCOOH 50:50. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)*

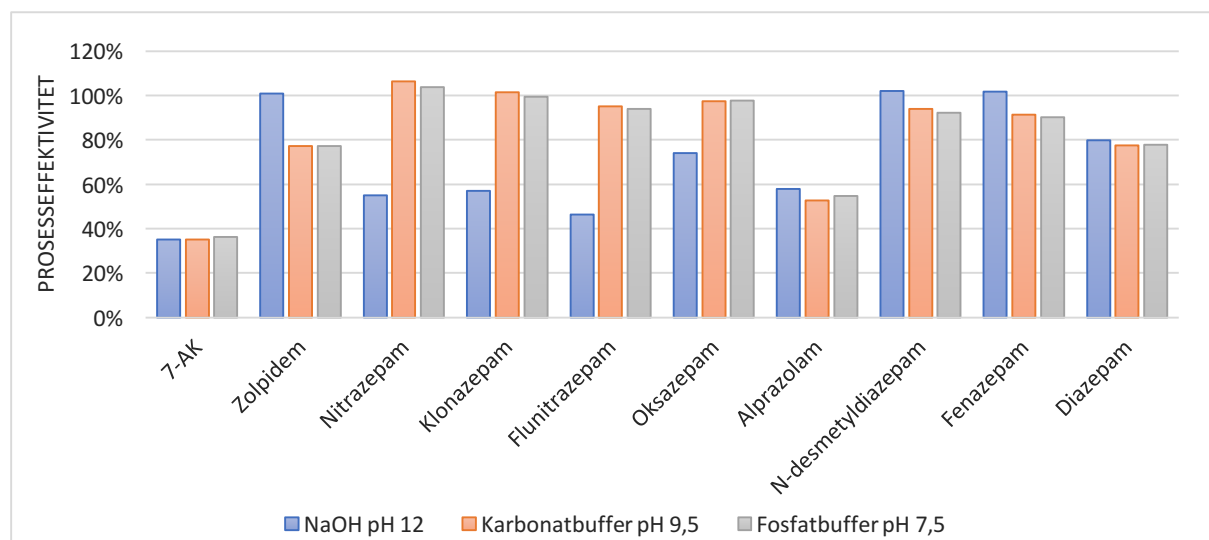
Blandinger av løsemidler ga generelt noe bedre prosesseffektivitet, unntatt blandingen som inneholdt DEHPi. Diheksyleter blandet med isopentylbenzen ga svært lav prosesseffektivitet for 7-aminoklonazepam og ble ikke tatt med i vurderingen. Ettersom undekanon blandet med isopentylbenzen ga generelt god prosesseffektivitet ble blandingen først valgt til videre forsøk. Mangel av isopentylbenzen oppstod under optimalisering av akseptorløsning, og forurensninger ble oppdaget ved bruk av pentylbenzen istedenfor isopentylbenzen. Siden blandingen av undekanon og diheksyleter ga tilsvarende god prosesseffektivitet, ble denne blandingen benyttet som organisk væskemembran i videre optimalisering.

### 4.2.3 Prøveløsning

#### Endring av pH i prøveløsning

Med tanke på at benzodiazepiner er upolare med generelt lave pKa-verdier, hadde sterk base i prøveløsningen mindre betydning for å holde analyttene i nøytral form og bidra til økning i prosesseffektivitet. For å undersøke hvorvidt pH i prøveløsningen påvirket prosesseffektiviteten, ble det laget prøveløsninger i henholdsvis 10 mM NaOH (pH 12); 0,1 mM karbonatbuffer (pH 9,5) og 50 mM fosfatbuffer (pH 7,5).

Resultatet er presentert i **Figur 14** som viser at det var lite forskjell i prosesseffektivitetene for karbonatbuffer og fosfatbuffer. I forhold til NaOH forbedret fosfatbuffer prosesseffektiviteten betydelig for nitrazepam, klonazepam, flunitrazepam og oksazepam. En mulig årsak kan være at disse analyttene er spesielt utsatt for degradering i sterk base, noe som medførte lav prosesseffektivitet for analyttene løst i 10 mM NaOH. Øvrige analytter unntatt 7-aminoklonazepam fikk noe reduksjon i prosesseffektivitet, spesielt for zolpidem. Ettersom økningen i prosesseffektiviteten totalt sett var større enn reduksjonen, og at fullblod har fysiologisk pH tilnærmet 7,5, ble fosfatbuffer brukt videre. Ekstraksjon med pH 7,5 tydet på muligheten for å ekstrahere prøveløsning uten tilsetning av buffer, og en mer forenklet ekstraksjonsprosedyre. Dette ble undersøkt og er beskrevet nærmere i videre avsnitt.



**Figur 14: Sammenligning av ulike pH i prøveløsning.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250  $\mu$ l prøveløsning (1  $\mu$ g/ml). Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l undekanon:diheksyleter 1:1 med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 100  $\mu$ l DMSO:200 mM HCOOH 75:25. Ekstraksjonstid: 45 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

### Ekstraksjon fra fullblod og plasma med buffer

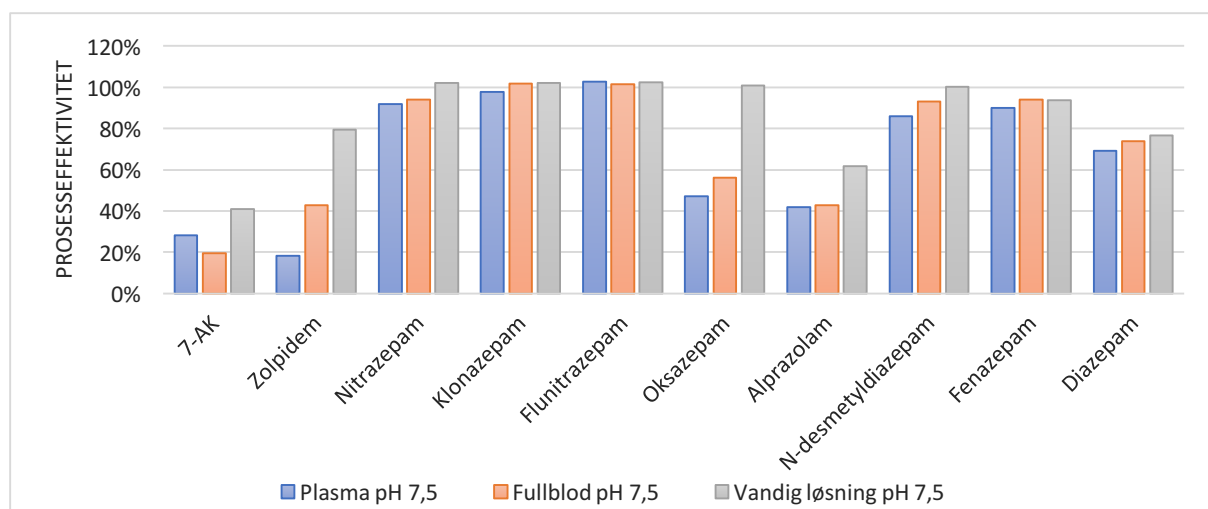
Innledende optimaliseringsforsøk ble utført med vandige prøveløsninger. Ettersom autentiske prøver vil være i biologiske matrikser, var det nødvendig å teste ekstraksjonsmetoden på fullblod og plasma. I forsøket ble analyttene ekstrahert fra fullblod, plasma og vandig løsning. 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5 ble tilsatt i alle prøvene siden bufferløsningen ga best prosesseffektivitet ved ekstraksjon fra vandige prøveløsninger. Imidlertid er fullblod og plasma forskjellige fra vandige løsninger, og bufferkapasiteten kan gjøre at det trengs sterkere base for å oppnå samme pH som i en vandig løsning [3, 62]. Det er derfor ikke gitt at pH 7,5 vil gi samme resultat for vandig løsning som for biologiske matrikser. En sammenligning av prosesseffektiviteten for plasma og vandig løsning ved ekstraksjon med 10 mM NaOH med pH 12 ble derfor også inkludert.

Det totale prøveoppsettet ble da:

- Fullblodprøver i 50 mM fosfatbuffer (pH 7,5)
- Plasmaprøver i 50 mM fosfatbuffer (pH 7,5)
- Vandig prøveløsning i 50 mM fosfatbuffer (pH 7,5)
- Plasmaprøver i 10 mM NaOH (pH 12)
- Vandig prøveløsning i 10 mM NaOH (pH 12)

Prosesseffektivitet for hver prøveløsning ble beregnet og sammenlignet.

Resultatet viste at i likhet med vandige prøveløsninger fikk plasmaprøver lavere prosesseffektivitet ved bruk av 10 mM NaOH. Ved sammenligning mellom ekstraksjon fra fullblod, plasma og vandige løsninger i fosfatbuffer, var det lite forskjell mellom prosesseffektiviteten, med unntak av 7-aminoklonazepam, zolpidem, oksazepam og alprazolam (**Figur 15**). Analyttene fikk noe reduksjon i prosesseffektivitet når de ble ekstrahert fra fullblod i forhold til vandige prøveløsninger. Dette gjaldt særlig zolpidem og oksazepam. Det var lite forskjell mellom plasma og fullblod i prosesseffektivitet, men ettersom rettstoksikologiske analyser utføres i fullblod, ble videre arbeid likevel utført med fullblod som analysemedium.



**Figur 15: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet for ulike prøvematrikser.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 250  $\mu$ l prøveløsning i 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l undekanon:diheksyleter 1:1 med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 100  $\mu$ l DMSO:200 mM HCOOH 75:25. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4, for fullblod er n=3)

### Ekstraksjon uten buffer

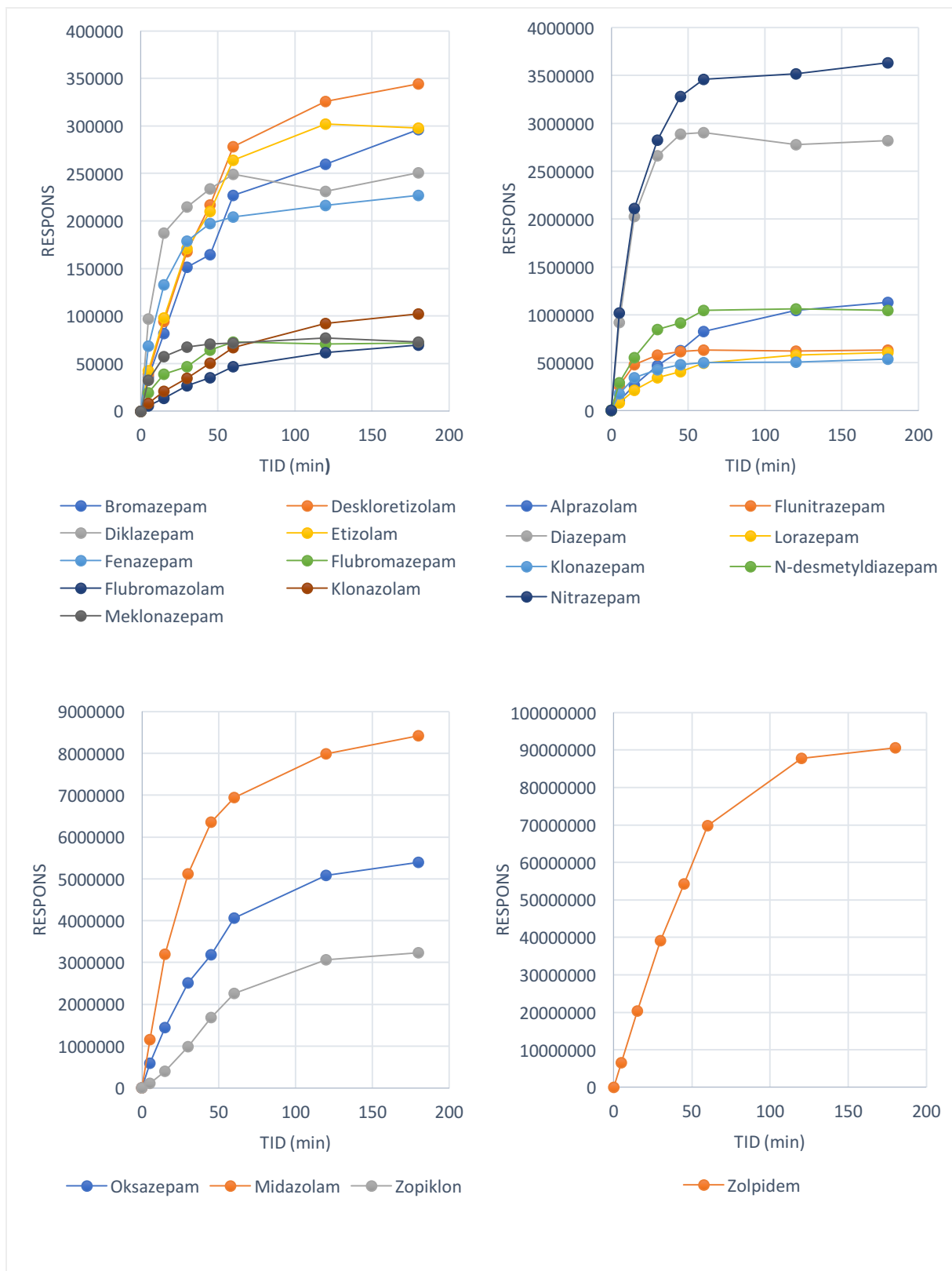
Ekstraksjon med og uten tilsetning av buffer ble også utført for å undersøke muligheten for å ha minst mulig arbeid ved bruk av metoden. Fem standarder og to kontroller fra OUS som inneholdt diverse benzodiazepiner ble benyttet.

Det ble ekstrahert to serier med kun én parallell ettersom kun noen få milliliter av fullblod var tilgjengelig. I den ene serien ble 100  $\mu$ l fullblodprøve og 150  $\mu$ l 50 mM fosfatbuffer (pH 7,5) tilsatt i donorbrønnen for hver standard og kontroll, mens i den andre serien ble 250  $\mu$ l fullblodprøve tilsatt i donorbrønnen uten buffer. Det ble laget standardkver for begge seriene, og linearitet ( $R^2$ ) på over 0,99 ble beregnet for alle analyttene i begge seriene. Det tydet på en direkte sammenheng mellom konsentrasjon og respons fra analyttene. Samtidig ga ekstraksjon uten tilsetning av bufferløsning betydelig mindre signalintensitet sammenlignet med ekstraksjon med buffer. Årsaken var muligens at fullblod har stor viskositet, og uten tilsetning av buffer ble det mindre agitasjon i prøveløsningen ved risting av PALME-oppsettet. Dette ville gitt mindre kontakt mellom prøveløsningen og den organiske væskemembranen, og dermed mindre transport av analytt over membranen. Det ble bestemt å tilsette buffer i prøveløsningene som tidligere.

#### 4.2.4 Ekstraksjonstid

En tidskurve for metoden ble laget ved å ekstrahere analyttene med ekstraksjonstider på 5, 15, 30, 45, 60, 120 og 180 minutter. Analyserepertoaret ble utvidet med flere designerbenzodiazepiner, og 7-aminoklonazepam ble tatt ut ettersom det i rutineanalyse ved OUS vanligvis er moderstoffene som analyseres i blod og ikke metabolittene. Fullblodprøve som inneholdt analyttene var hentet fra OUS. Tidskurven er vist i **Figur 16** hvor signalintensitet er plottet som funksjon av tid. Det viste seg at det fortsatt var noe økning i signalintensitet etter 45 minutter, og ved 60 minutter begynte økningen å flate ut for de fleste analyttene. Siden de fleste stoffene nærmet seg likevekt ble ekstraksjonstiden satt til 60 minutter for å begrense tidsbruken.





**Figur 16: Tidskurve for benzodiazepiner og z-hypnotika.** Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 100  $\mu$ l fullblodprøver, 130  $\mu$ l 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5, 20  $\mu$ l internstandard. Organisk væskemembran: 3  $\mu$ l undekanon:diheksyleter 1:1 med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 100  $\mu$ l DMSO:200 mM HCOOH 75:25. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

#### 4.2.5 Automatisering

96-brønnsformatet i PALME muliggjør ekstraksjon av 96 prøver samtidig, og metoden kunne dermed delvis automatiseres ved å overføre væskeløsninger ved hjelp av en 96-kanalpipette. På den måten ble arbeidet i ekstraksjonen kraftig forenklet. Siden pipettering med 96-kanalpipetten krevde relativt stort væskevolum i et oppsamlingskar, ble en multipipette benyttet til pipettering av internstandard og organisk væskemembran. Ved fortynning av ekstrakt ble vann og ekstrakt pipettert i likt volum i en 96-brønnsplate med spisse bunner. I stedet for å blande løsningene én og én i smale vialer ved bruk av en pipette, kunne platen forsegles og settes på resting i 30 sekunder, slik at løsningene i brønnene ble blandet godt sammen. En annen fordel med platen var at den kunne plasseres direkte i autosampleren i analyseinstrumentet for analyse.

I forhold til vialene, krevde brønnene i analyseplaten et større væskevolum for å kunne gi reproducerbar injeksjon. Volumet av akseptorløsning i akseptorbrønnen ble dermed økt til 150  $\mu\text{l}$  slik at et større volum av ekstrakter kunne overføres til brønnene i analyseplaten etter ekstraksjon. I denne sammenhengen ble fortynning av ekstrakt i tillegg en fordel ettersom volumet i analyseplaten ble økt ytterligere.

Ved bruk av multipipette var det vanskelig å fordele organiske løsemidler jevnt utover på membranen i forhold til finnpipette. Volum av organisk løsemiddel ble dermed økt fra 3  $\mu\text{l}$  til 4  $\mu\text{l}$ . Ved ekstraksjon av standarder og kontroller ga metoden linearitet ( $R^2$ ) på over 0,99 for alle analytter, og metoden ble benyttet til validering.

### 4.3 Metodevalidering

Den delvis automatiserte metoden for benzodiazepiner ble validert med hensyn på linearitet, nøyaktighet og presisjon, ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, LOQ, LOD, overdrag, spesifisitet og stabilitet.

#### 4.3.1 Linearitet

Validering av linearitet ble utført ved å analysere to serier standarder og kontroller direkte etter hverandre. Linearitet for hver analytt ble beregnet basert på ti konsentrasjonsnivåer med vektning  $1/x$ . Kalibreringskurvene er vist i **Vedlegg 1**, og resultatet er oppsummert i **Tabell 4.4**. Det viste at de fleste kalibreringskurvene ga tilfredsstillende linearitet med  $R^2 \geq 0,99$  som indikerte en god korrelasjon mellom konsentrasjon og signalintensitet. Lorazepam hadde ikke lineær

respons, og måtte beregnes ved hjelp av kvadratisk tilpasning. Dette ga bedre tilpasning og en  $R^2$  på 0,997. Alprazolam, bromazepam, klonazolam, zolpidem og zopiklon ga litt lavere  $R^2$  som fortsatt er over 0,98. Dette kan skyldes at analyttene er mer påvirket av instrumentelle forhold, noe som gjør at analyttens respons var mer varierende for enkelte konsentrasjonsnivå. Dersom linearitet beregnes for gjennomsnittet av responsene fra hvert konsentrasjonsnivå mot internstandard, ble linearitet til analyttene betydelig forbedret. Alle analyttene fikk  $R^2 \geq 0,99$  som oppgitt i **Tabell 4.4**. Kalibreringskurvene som ble laget basert på gjennomsnitt kan sees i **Vedlegg 2**.

**Tabell 4.4: Linearitet for kalibreringskurvene.**

Forbindelse	Internstandard	$R^2$ for hver respons (n=6)	$R^2$ for gjennomsnittsverdi (n=6)
Alprazolam	Alprazolam-d5	0,989	0,992
Bromazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,986	0,998
Deskloretizolam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,990	0,999
Diazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,993	1,000
Diklazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,992	0,998
Etizolam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,991	0,999
Fenazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,992	0,999
Flubromazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,991	0,999
Flubromazolam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,991	0,999
Flunitrazepam	Flunitrazepam-d7	0,997	0,999
Klonazepam	$^{13}\text{C}_6$ -klonazepam	0,998	1,000
Klonazolam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,983	0,999
Lorazepam*	Lorazepam-d4	0,996	0,999
Meklonazepam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,990	1,000
Midazolam	$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,991	0,999
N-desmetyldiazepam	$^{13}\text{C}_6$ -N-desmetyldiazepam	0,998	1,000
Nitrazepam	Nitrazepam-d5	0,997	0,999
Oksazepam	$^{13}\text{C}_6$ -oksazepam	0,999	1,000
Zolpidem	Zolpidem-d6	0,987	0,998
Zopiklon	Zopiklon-d8	0,983	0,999

*Ekstraksjonsbetingelser: donorbrønn: 100  $\mu\text{l}$  fullblodprøver, 130  $\mu\text{l}$  50 mM fosfatbuffer med pH 7,5, 20  $\mu\text{l}$  internstandard. Organisk væskemembran: 4  $\mu\text{l}$  undekanon:diheksyleter 1:1 med 1 % TOA. Akseptorbrønn: 150  $\mu\text{l}$  DMSO:200 mM HCOOH 75:25. Ekstraksjonstid: 60 minutter. Ristehastighet: 900 rpm.*

*\*Lorazepam er beregnet med kvadratisk kurve.*

### 4.3.2 Nøyaktighet og presisjon

Presisjon ble oppgitt som relativt standardavvik, RSD. Ifølge EMA sin retningslinje for metodevalidering skal RSD være innenfor 15 % for alle konsentrasjonsnivåer, unntatt for laveste konsentrasjonsnivå, der kravet er 20 % [63]. Nøyaktighet uttrykker avvik fra referanseverdien, og ble beregnet som relativ feil. Avviket skal være innenfor 15 % (20 % for laveste konsentrasjonsnivå).

#### Nøyaktighet og presisjon innen serie

RSD og relativ feil er oppsummert i **Tabell 4.5**. Alle RSD-verdiene var innenfor grensen, dette innebar at det var lite variasjon mellom resultatene fra samme prøve. Relativ feil oppfylte kravet i stor grad. Flubromazolam og meklonazepam fikk relativ feil over 15 % for kontroll 3. Dette tydet på noe lavere nøyaktighet for disse stoffene. Siden det kun var noen få unntak, og verdiene var under 20 %, kunne det skyldes tilfeldige feil i analyseinstrumentet under analysen. Resultatet ble ansett som akseptabelt, og det ble konkludert med at analysemetoden hadde god repeterbarhet og ga resultater med god nøyaktighet.

**Tabell 4.5: RSD og relativ feil i validering av nøyaktighet og presisjon innen serie.**

Forbindelse		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
		n=10	n=9	n=8	n=8
<b>Alprazolam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	53	220	471
	RSD	3 %	6 %	5 %	8 %
	Relativ feil	4 %	7 %	10 %	2 %
<b>Bromazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	48	209	448
	RSD	6 %	5 %	7 %	8 %
	Relativ feil	3 %	-3 %	4 %	-3 %
<b>Deskloretizolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,7	7,2	29	65
	RSD	6 %	5 %	7 %	8 %
	Relativ feil	14 %	8 %	10 %	5 %
<b>Diazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	28	53	216	479
	RSD	4 %	4 %	6 %	8 %
	Relativ feil	16 %	7 %	8 %	4 %
<b>Diklazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,7	6,9	28	65

	RSD	4 %	5 %	6 %	8 %
	Relativ feil	17 %	4 %	6 %	5 %
<b>Etizolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,8	7,2	30	65
	RSD	3 %	5 %	6 %	8 %
	Relativ feil	18 %	7 %	12 %	6 %
<b>Fenazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,7	6,8	30	66
	RSD	6 %	6 %	7 %	7 %
	Relativ feil	16 %	2 %	14 %	8 %
<b>Flubromazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,7	6,8	29	65
	RSD	6 %	7 %	7 %	8 %
	Relativ feil	16 %	2 %	9 %	5 %
<b>Flubromazolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,8	7,5	32	66
	RSD	4 %	7 %	7 %	9 %
	Relativ feil	18 %	12 %	19 %	7 %
<b>Flunitrazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,6	7,1	28	64
	RSD	6 %	3 %	6 %	9 %
	Relativ feil	13 %	7 %	6 %	4 %
<b>Klonazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,5	7,2	29	64
	RSD	6 %	5 %	5 %	8 %
	Relativ feil	9 %	8 %	8 %	4 %
<b>Klonazolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,7	7,0	30	63
	RSD	5 %	6 %	6 %	7 %
	Relativ feil	15 %	6 %	12 %	2 %
<b>Lorazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	26	55	218	428
	RSD	9 %	7 %	6 %	11 %
	Relativ feil	9 %	10 %	9 %	-7 %
<b>Meklonazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,6	7,7	31	68
	RSD	11 %	7 %	7 %	6 %
	Relativ feil	13 %	15 %	17 %	10 %
<b>Midazolam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	28	53	226	511
	RSD	3 %	5 %	6 %	3 %

	Relativ feil	15 %	6 %	13 %	11 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	26	54	217	489
	RSD	4 %	4 %	6 %	7 %
	Relativ feil	10 %	8 %	8 %	6 %
<b>Nitrazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	53	216	479
	RSD	5 %	6 %	5 %	9 %
	Relativ feil	3 %	6 %	8 %	4 %
<b>Oksazepam</b>	Teoretisk	160	333	1333	3077
	Målt	169	356	1409	3138
	RSD	4 %	4 %	6 %	8 %
	Relativ feil	6 %	7 %	6 %	2 %
<b>Zolpidem</b>	Teoretisk	40	83	333	769
	Målt	45	84	351	804
	RSD	3 %	5 %	5 %	9 %
	Relativ feil	13 %	1 %	6 %	5 %
<b>Zopiklon</b>	Teoretisk	8,0	17	67	154
	Målt	9,2	18	67	141
	RSD	2 %	6 %	5 %	9 %
	Relativ feil	16 %	7 %	0 %	-8 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som **Tabell 4.4**.*

### **Nøyaktighet og presisjon mellom serier**

Det ble utført validering av presisjon mellom serier over åtte dager. Som presentert i **Tabell 4.6** oppfylte RSD og relativ feil kravene for alle analyttene. Zopiklon fikk først høy RSD-verdi som følge av stor variasjon mellom resultatene fra forskjellige serier. Avvik på over 50 % fra gjennomsnittverdien ble sett for alle parallellene ved den siste serien. Konsentrasjonene som ble beregnet var svært lave i forhold til teoretiske verdier. Ettersom resultatet fra de syv første seriene viste god nøyaktighet, og at en annen arbeidsløsning ble benyttet i den siste serien, kunne det skyldes feil i tillaging av arbeidsløsningen til z-hypnotika. RSD ble redusert fra 24 % til 16 % når verdiene fra siste serien ble tatt bort. Totalt sett har analysemetoden vist god reproduserbarhet, og gir data med god nøyaktighet.

**Tabell 4.6: RSD og relativ feil i validering av nøyaktighet og presisjon mellom serie.**

Forbindelse		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
		n=24*	n=24	n=24	n=24
<b>Alprazolam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	24	49	206	474
	RSD	7 %	8 %	7 %	6 %
	Relativ feil	0 %	-2 %	3 %	3 %
<b>Bromazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	24	49	203	466
	RSD	8 %	6 %	8 %	6 %
	Relativ feil	2 %	-2 %	2 %	1 %
<b>Deskloretizolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,4	6,5	27	63
	RSD	10 %	8 %	8 %	7 %
	Relativ feil	5 %	-3 %	1 %	2 %
<b>Diazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	49	202	475
	RSD	8 %	8 %	8 %	6 %
	Relativ feil	5 %	-3 %	1 %	3 %
<b>Diklazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,5	6,4	26	64
	RSD	8 %	7 %	8 %	7 %
	Relativ feil	9 %	-4 %	-1 %	3 %
<b>Etizolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,4	6,4	27	63
	RSD	10 %	8 %	8 %	7 %
	Relativ feil	6 %	-4 %	2 %	2 %
<b>Fenazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,4	6,4	27	64
	RSD	10 %	7 %	9 %	7 %
	Relativ feil	7 %	-4 %	3 %	3 %
<b>Flubromazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,4	6,4	27	63
	RSD	9 %	7 %	9 %	7 %
	Relativ feil	6 %	-4 %	0 %	2 %
<b>Flubromazolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,3	6,7	28	63
	RSD	11 %	8 %	9 %	8 %
	Relativ feil	4 %	1 %	5 %	1 %
<b>Flunitrazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,2	6,2	25	62
	RSD	8 %	11 %	12 %	11 %
	Relativ feil	1 %	-7 %	-6 %	1 %
<b>Klonazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62

	Målt	3,2	6,6	27	63
	RSD	7 %	6 %	6 %	6 %
	Relativ feil	1 %	0 %	2 %	2 %
<b>Klonazolam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,4	6,6	27	63
	RSD	10 %	8 %	10 %	8 %
	Relativ feil	6 %	-1 %	2 %	2 %
<b>Lorazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	56	220	455
	RSD	12 %	11 %	9 %	7 %
	Relativ feil	5 %	12 %	10 %	-1 %
<b>Meklonazepam</b>	Teoretisk	3,2	6,7	27	62
	Målt	3,3	6,8	28	64
	RSD	12 %	10 %	9 %	8 %
	Relativ feil	4 %	1 %	4 %	3 %
<b>Midazolam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	26	48	208	480
	RSD	8 %	8 %	8 %	7 %
	Relativ feil	7 %	-3 %	4 %	4 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	25	50	203	473
	RSD	7 %	7 %	7 %	5 %
	Relativ feil	3 %	-1 %	2 %	2 %
<b>Nitrazepam</b>	Teoretisk	24	50	200	462
	Målt	24	51	208	474
	RSD	7 %	6 %	4 %	5 %
	Relativ feil	1 %	2 %	4 %	3 %
<b>Oksazepam</b>	Teoretisk	160	333	1333	3077
	Målt	162	334	1356	3151
	RSD	7 %	5 %	5 %	5 %
	Relativ feil	1 %	0 %	2 %	2 %
<b>Zolpidem</b>	Teoretisk	40	83	333	769
	Målt	42	81	345	784
	RSD	10 %	8 %	7 %	7 %
	Relativ feil	5 %	-3 %	3 %	2 %
<b>Zopiklon</b>	Teoretisk	8,0	17	67	154
	Målt	8,2	19	69	152
	RSD	16 %	12 %	11 %	9 %
	Relativ feil	3 %	13 %	3 %	-2 %

Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som **Tabell 4.4**.

\* For zopiklon er n=21, pga. fjerning av uteliggere fra en enkelt serie.



### 4.3.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon

Ved validering av nøyaktighet og presisjon ble LOQ også validert samtidig. Siden RSD-verdi og relativ feil til det laveste konsentrasjonsnivået (kontroll 1) oppfylte kravet for nøyaktighet og presisjon, regnes konsentrasjonen i kontroll 1 som LOQ. LOQ var i området 3,2-160 ng/ml og er oppsummert i **Vedlegg 3**.

### 4.3.4 Minste detekterbare konsentrasjon

LOD til analyttene ble undersøkt ved å ekstrahere en forfynningsrekke av laveste standard. Minste konsentrasjon som ga signal-til-støy forhold  $\geq 3$  ble identifisert. LOD for fenazepam, flubromazepam, klonazepam og meklonazepam var på 0,2 ng/ml, mens for lorazepam var LOD på 1,5 ng/ml. For de øvrige analyttene ble det fortsatt observert sterke signaler ved 20 ganger forfynning av laveste standard. LOD for analyttene kunne blitt undersøkt med enda lavere konsentrasjoner, men det ble ikke anledning til dette. Dette viste at selv ved forfynning av ekstrakt, og stort volum av akseptorløsning, klarte analysemetoden å detektere analytter i lave konsentrasjoner. Dette kan være et resultat av høyt utbytte av analytter ved bruk av PALME og høy følsomhet av LC-MS/MS. En tabell av LOD til alle analytter kan sees i **Vedlegg 3**.

### 4.3.5 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbytte er en viktig del i utvikling av ekstraksjonsmetoder ettersom minst mulig tap av analytt under ekstraksjon er ønskelig. Ved høyt ekstraksjonsutbytte oppnås blant annet lavere deteksjonsgrense og kvantifiseringsgrense.

Ekstraksjonsutbytte for fire konsentrasjonsnivåer ble undersøkt. Resultat av ekstraksjonsutbyttene er oppsummert i **Tabell 4.7**. Metoden ga generelt tilfredsstillende ekstraksjonsutbytte på over 70 % for de fleste stoffer, og syv av 20 analytter fikk utbytte tilnærmet 100 %. Alprazolam, bromazepam, flubromazolam og klonazolam hadde noe lavere utbytter (52-68 %).

**Tabell 4.7: Ekstraksjonsutbytte i prosent.**

Forbindelse	Kontroll 1* n=4	Kontroll 2 n=6	Kontroll 3 n=6	Kontroll 4 n=6
Alprazolam	119 %	60 %	55 %	67 %
Bromazepam	111 %	68 %	68 %	70 %
Deskloretizolam	134 %	74 %	70 %	70 %
Diazepam	126 %	92 %	88 %	89 %
Diklazepam	128 %	99 %	95 %	93 %
Etizolam	143 %	85 %	79 %	78 %
Fenazepam	135 %	104 %	102 %	98 %
Flubromazepam	144 %	102 %	101 %	98 %
Flubromazolam	126 %	66 %	65 %	68 %
Flunitrazepam	127 %	101 %	98 %	101 %
Klonazepam	129 %	100 %	101 %	104 %
Klonazolam	102 %	53 %	52 %	53 %
Lorazepam	144 %	88 %	85 %	86 %
Meklonazepam	140 %	100 %	103 %	102 %
Midazolam	147 %	100 %	97 %	96 %
N-desmetyldiazepam	132 %	98 %	96 %	95 %
Nitrazepam	131 %	99 %	97 %	96 %
Oksazepam	128 %	71 %	72 %	73 %
Zolpidem	149 %	75 %	68 %	71 %
Zopiklon	415 %	58 %	67 %	77 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som Tabell 4.4.*

*\*Pga. stort avvik fra andre kontroller ble ikke resultatet for kontroll 1 tatt med i vurdering.*

Ekstraksjonsutbytte for ulike konsentrasjonsnivåer var relativt jevnt for samtlige analytter, unntatt zopiklon og for alle analyttene i kontroll 1. I forhold til kontroll 2-4, ga alle analyttene i kontroll 1 vesentlig høyere ekstraksjonsutbytte for flere analytter. Årsaken kan ha vært feil tillaging av kontroll 1, og resultatet ble ikke tatt med i vurderingen. Zopiklon fikk også en forskjell på 19 % i utbytte mellom kontroll 2 og 4, og viste en tendens til økende utbytte ved økende konsentrasjon. Årsaken til konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte kan være uspesifikk binding til membranen av PVDF-materiale for denne analytten.

Prosesseffektivitet ble i tillegg beregnet og er oppsummert i **Vedlegg 4**. Resultatet viser prosesseffektivitet mellom 52-102 % for samtlige analytter. Sammenlignet med innledende forsøk, hvor den optimaliserte ekstraksjonsmetoden til basiske upolare substanser ble benyttet til ekstraksjon av benzodiazepiner, oppnådde den endelige ekstraksjonsmetoden en betydelig økning i prosesseffektivitet. I optimaliseringsforsøkene som ble utført, var tilsetning av DMSO

i akseptorløsning og endring av bufferløsning i donorbrønnen det som bidro mest til økning i prosesseffektivitet.

#### 4.3.6 Matrikseffekter

Som nevnt i forbindelse med avsnitt 1.1, kan biologiske matrikser forårsake matrikseffekter og dermed redusere nøyaktighet og presisjon i analysen. LC-MS er spesielt utsatt for matrikseffekter, derfor er dette en viktig parameter som bør vurderes i valideringen. Matrikseffekter fra seks ulike batcher fullblod ble undersøkt på fire konsentrasjonsnivåer (kontroll 1-4), og ble beregnet med Matuszewskis metode [7].

I følge EMA sin retningslinje skal matrikseffekter ikke overskride 100 % med  $\pm 15$  %. RSD skal også være innenfor 15 % [63]. Resultatet er oppgitt i **Tabell 4.8**. Alle verdiene var innenfor grensen, noe som bekreftet at det ikke oppstod matrikseffekter. Dette tydet på at ekstraksjonsmetoden eliminerte forurensningene i fullblod effektivt, og ga rene ekstrakter som var kompatible med LC-MS/MS. Resultatet for matrikseffekter korrigert med internstandard er vist i **Vedlegg 5** (med verdier mellom 92 % og 107 %).

**Tabell 4.8: Matrikseffekter (ME) og RSD i prosent (%) uten korreksjon mot internstandard.**

Forbindelse		Kontroll 1 n=6	Kontroll 2 n=6	Kontroll 3 n=6	Kontroll 4 n=6
<b>Alprazolam</b>	ME	87 %	87 %	90 %	94 %
	RSD	3 %	3 %	3 %	4 %
<b>Bromazepam</b>	ME	99 %	101 %	102 %	100 %
	RSD	2 %	3 %	2 %	2 %
<b>Deskloretizolam</b>	ME	87 %	94 %	93 %	94 %
	RSD	2 %	3 %	3 %	2 %
<b>Diazepam</b>	ME	94 %	96 %	95 %	95 %
	RSD	3 %	2 %	3 %	1 %
<b>Diklazepam</b>	ME	94 %	98 %	98 %	96 %
	RSD	4 %	3 %	3 %	2 %
<b>Etizolam</b>	ME	91 %	94 %	96 %	96 %
	RSD	3 %	4 %	3 %	2 %
<b>Fenazepam</b>	ME	89 %	93 %	103 %	98 %
	RSD	10 %	4 %	4 %	3 %
<b>Flubromazepam</b>	ME	97 %	102 %	97 %	98 %
	RSD	0 %	8 %	3 %	2 %
<b>Flubromazolam</b>	ME	88 %	89 %	93 %	92 %
	RSD	6 %	3 %	4 %	2 %

<b>Flunitrazepam</b>	ME	91 %	97 %	95 %	95 %
	RSD	3 %	2 %	3 %	2 %
<b>Klonazepam</b>	ME	98 %	97 %	98 %	97 %
	RSD	5 %	4 %	3 %	1 %
<b>Klonazolam</b>	ME	97 %	97 %	98 %	97 %
	RSD	3 %	3 %	2 %	1 %
<b>Lorazepam</b>	ME	103 %	103 %	107 %	103 %
	RSD	5 %	3 %	1 %	1 %
<b>Meklonazepam</b>	ME	102 %	99 %	95 %	98 %
	RSD	0 %	6 %	5 %	3 %
<b>Midazolam</b>	ME	90 %	91 %	94 %	94 %
	RSD	4 %	3 %	3 %	2 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	ME	95 %	95 %	97 %	96 %
	RSD	3 %	3 %	2 %	1 %
<b>Nitrazepam</b>	ME	98 %	99 %	98 %	98 %
	RSD	2 %	2 %	3 %	1 %
<b>Oksazepam</b>	ME	107 %	107 %	107 %	104 %
	RSD	3 %	2 %	2 %	1 %
<b>Zolpidem</b>	ME	95 %	97 %	98 %	99 %
	RSD	2 %	3 %	4 %	3 %
<b>Zopiklon</b>	ME	99 %	97 %	96 %	95 %
	RSD	2 %	4 %	4 %	4 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som **Tabell 4.4**.*

#### 4.3.7 Spesifisitet

Spesifisitet angir analysemetodens evne til å identifisere analyttene uten interferens fra andre substanser i prøven. I en analyse bør muligheten for falske positive responser utelukkes ettersom det kan medføre feilestimerte resultater. Ni standardløsninger som til sammen inneholdt 159 forbindelser ble analysert med analysesystemet.

For alprazolam ble det observert signal fra annen substans med samme m/z-verdi på både primær og sekundær overgang. Imidlertid var det 0,11 minutt avvik i retensjonstid, og ioneratio var 5,4 istedenfor 1,2. Dette signalet ga derfor ikke opphav til feilaktig identifikasjon som alprazolam. For øvrige analytter ble det ikke observert signal fra andre substanser med samme intensitet og retensjonstid. Det viste seg at analysemetoden hadde spesifikk identifisering, og ga akseptabel separasjon av substansene. Det må tilføyes at ettersom én blanding inneholdt deskloretizolam, ble spesifisitet til deskloretizolam ikke undersøkt for stoffene som var i samme

blanding. Dette kunne med fordel vært testet på nytt. En tabell i **Vedlegg 6** gir en oversikt over substansene som ble inkludert i forsøket.

#### 4.3.8 Overdrag

Overdrag kan oppstå etter injeksjon av analytt i høy konsentrasjon. Dette kan føre til falskt positivt resultat, med andre ord observert signal fra analytt ved analyse av rent ekstrakt. Ved svært høye konsentrasjoner kan også neste prøve foruresnes, slik at reanalyse ikke nødvendigvis kan utelukke overdrag. Ved analyse av analytt i lav konsentrasjon, etter en analyse av analytt i høy konsentrasjon, kan overdrag gi betydelig sterkere signal av analytt, som igjen medfører unøyaktig beregning av konsentrasjon.

Dersom signalintensiteten av analytt fra blankt ekstrakt analysert etter høy konsentrasjon er over 20 % av signalintensiteten av minste kvantifiserbare konsentrasjon (LOQ), regnes det som overdrag i henhold til EMAs retningslinjer [63]. Retningslinjene tar utgangspunkt i at dette skal gjelde innenfor kalibreringsområdet. For retts toksikologiske analyser der man kan få prøver fra for eksempel overdoser som ligger langt utenfor måleområdet, er det relevant å teste med svært høye konsentrasjoner.

Det ble laget konsentrerte løsninger av lavdoserte, høydoserte og z-hypnotika, med konsentrasjoner som var 25 ganger høyere enn høyeste standard. Løsningene ble injisert etterfulgt av tre blanke injeksjoner.

Som vist i **Tabell 4.9** var det flere analytter som fikk overdrag etter analyse av den svært høye konsentrasjonen. Ved analyse av overdosering på grunn av høyt inntak av stoffene skal derfor mulig overdrag vurderes ved rutineanalyse. En blank løsning kan eventuelt injiseres en gang etter analyse av prøver med forventet høy konsentrasjon. For klonazepam regnes det ikke som overdrag selv om resultatet var utenfor grensen, grunnen er at signalintensiteten som ble målt var fra bakgrunn i analyseinstrumentet. Dersom det var overdrag vil også signalintensiteten avta ved flere injeksjoner av blanke ekstrakter, noe som ikke ble sett for klonazepam.

**Tabell 4.9: Oversikt over overdrag fra blanke ekstrakter.**

Forbindelse	Blank 1	Blank 2	Blank 3
Alprazolam	24 %	3 %	1 %
Bromazepam	50 %	2 %	7 %
Deskloretizolam	24 %	1 %	1 %
Diazepam	19 %	1 %	0 %
Diklazepam	15 %	0 %	0 %
Etizolam	21 %	2 %	1 %
Fenazepam	14 %	1 %	1 %
Flubromazepam	14 %	1 %	2 %
Flubromazolam	20 %	2 %	1 %
Flunitrazepam	20 %	0 %	1 %
Klonazepam	38 %	28 %	26 %
Klonazolam	14 %	1 %	1 %
Lorazepam	23 %	0 %	0 %
Meklonazepam	1 %	4 %	0 %
Midazolam	27 %	3 %	1 %
N-desmetyldiazepam	19 %	0 %	0 %
Nitrazepam	16 %	1 %	0 %
Oksazepam	17 %	1 %	0 %
Zolpidem	35 %	7 %	4 %
Zopiklon	81 %	21 %	4 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som **Tabell 4.4**.*

#### 4.3.9 Stabilitet

I noen tilfeller må ekstrakter oppbevares i kjøleskap eller fryser for senere analyse. Under oppbevaringen kan analyttene degradere, og stabiliteten til analyttene i ekstraktene ble derfor undersøkt. Etter analyse av en serie ble analyseplaten som inneholdt ekstrakter oppbevart i autosampleren ved 10°C i fire dager. Ekstraktene ble reanalysert, og avvikene fra opprinnelig målt konsentrasjon ble beregnet. Det samme ble utført med oppbevaring av ekstrakter i fryseren ved -20°C i ti dager. Avviksgrensen i EMA sin retningslinje er  $\pm 15\%$  [63]. Ved stort avvik fra opprinnelig konsentrasjon kunne det tyde på degradering av analytter og dermed dårlig stabilitet. Avvikene av samtlige analytter er oppsummert i **Tabell 4.10** og **Tabell 4.11**.

**Tabell 4.10: Avvik i prosent (%) fra opprinnelig målt konsentrasjon etter oppbevaring ved 10°C i autosampleren i fire dager, snitt av tre paralleller.**

Forbindelse	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
	n=3	n=3	n=3	n=3
Alprazolam	-4 %	0 %	2 %	-6 %
Bromazepam	-5 %	-2 %	1 %	1 %
Deskloretizolam	4 %	1 %	1 %	2 %
Diazepam	-2 %	-2 %	0 %	-1 %
Diklazepam	1 %	0 %	-2 %	-2 %
Etizolam	0 %	-1 %	0 %	0 %
Fenazepam	-4 %	-6 %	2 %	1 %
Flubromazepam	-4 %	0 %	-3 %	-3 %
Flubromazolam	0 %	-3 %	2 %	2 %
Flunitrazepam	2 %	-1 %	2 %	3 %
Klonazepam	-6 %	1 %	1 %	0 %
Klonazolam	6 %	0 %	4 %	1 %
Lorazepam	3 %	1 %	-3 %	-7 %
Meklonazepam	7 %	2 %	-3 %	-1 %
Midazolam	2 %	-2 %	3 %	1 %
N-desmetyldiazepam	-1 %	-1 %	0 %	2 %
Nitrazepam	-5 %	-1 %	-1 %	-1 %
Oksazepam	0 %	-2 %	-3 %	-1 %
Zolpidem	-3 %	-2 %	-2 %	-1 %
Zopiklon	-3 %	1 %	1 %	1 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som Tabell 4.4.*

**Tabell 4.11: Avvik i prosent (%) fra opprinnelig målt konsentrasjon etter oppbevaring ved -20°C i fryseren i ti dager, snitt av tre paralleller.**

Forbindelse	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
	n=3	n=3	n=3	n=3
Alprazolam	4 %	5 %	0 %	4 %
Bromazepam	3 %	-3 %	-3 %	-2 %
Deskloretizolam	4 %	0 %	6 %	0 %
Diazepam	7 %	0 %	0 %	-2 %
Diklazepam	7 %	3 %	-1 %	-1 %
Etizolam	7 %	0 %	1 %	0 %
Fenazepam	8 %	-4 %	4 %	-2 %
Flubromazepam	6 %	-2 %	-1 %	-3 %
Flubromazolam	2 %	0 %	4 %	2 %
Flunitrazepam	1 %	6 %	5 %	-1 %
Klonazepam	2 %	5 %	-5 %	-1 %
Klonazolam	4 %	3 %	2 %	0 %

<b>Lorazepam</b>	-14 %	-11 %	-3 %	10 %
<b>Meklonazepam</b>	-2 %	5 %	4 %	3 %
<b>Midazolam</b>	6 %	2 %	4 %	0 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	5 %	2 %	1 %	-2 %
<b>Nitrazepam</b>	0 %	-4 %	-3 %	-3 %
<b>Oksazepam</b>	2 %	-1 %	-2 %	-2 %
<b>Zolpidem</b>	5 %	2 %	0 %	-2 %
<b>Zopiklon</b>	4 %	4 %	-4 %	-4 %

*Ekstraksjonsbetingelser: identiske betingelser som **Tabell 4.4**.*

Avvikene var innenfor  $\pm 15$  % for alle stoffer, og resultatet anses som akseptabelt. Dette indikerte god stabilitet av analyttene i ekstraktene, og at det er mulighet for senere analyse av ekstrakter. Stabiliteten til analyttene i ekstraktene i romtemperatur og i fullblod kunne med fordel blitt undersøkt med hensyn på praktisk rutineanalyse, men dette ble det ikke anledning til.



## 5 Konklusjon

I denne oppgaven ble PALME utprøvd for et større utvalg rusgivende stoffer. PALME ble benyttet for første gang til prøveopparbeidelse for benzodiazepiner (og benzodiazepinlignende stoffer). Ved optimalisering av ulike ekstraksjonsparametere ble det utviklet en PALME-metode for stoffene med fullblod som analysemedium. Flere basiske upolare substanser ble også ekstrahert fra vandige prøveløsninger og ekstraksjonsmetoden ble optimalisert med tilfredsstillende resultat. Både UHPLC-UV og UHPLC-MS/MS ble benyttet til analyse. Den optimaliserte metoden for benzodiazepiner (og benzodiazepinlignende stoffer) ble brukt i kombinasjon med UHPLC-MS/MS, og metoden ble validert for å sikre pålitelige analysedata.

Den endelige prosedyren for ekstraksjon av benzodiazepiner fra fullblod ble utført ved å tilsette 100 µl fullblodprøve, 130 µl 50 mM fosfatbuffer med pH 7,5 og 20 µl internstandard i donorbrønningen. Det ble benyttet 4 µl undekanon blandet med diheksyleter i forholdet 1:1 (w/w) med 1 % TOA (w/w) som organisk væskemembran, og 150 µl DMSO blandet med 200 mM HCOOH i forholdet 75:25 (v/v) ble tilsatt i akseptorbrønningen. Platene ble satt sammen og topplaten ble forseglet. Oppsettet ble satt på resting i 60 minutter for å fremme ekstraksjonen. Prøvene ble fortynnet 1:1 med vann før LC-MS/MS-analyse.

96-brønnsformatet i PALME ga mulighet for automatisering og ekstraksjon av 96 prøver samtidig. Ved bruk av en 96-kanalpipette til overføring av væskeløsninger ble både tid og arbeid i forbindelse med prøveopparbeidelsen kraftig redusert. Siden pipettering med 96-kanalpipetten krevde relativt stort væskevolum i et oppsamlingskar, ble internstandard og væskemembran pipettert med en multipipette. Overføring og fortynning direkte i en ny 96-brønnplate som kunne plasseres direkte i autosamleren til analyse ga totalt sett en meget effektiv ekstraksjonsprosedyre.

Prosedyren med ovennevnte betingelser ble validert. Resultatet viste at analysemetoden ga tilfredsstillende ekstraksjonsutbytte for benzodiazepiner med akseptabel nøyaktighet og presisjon. Analyttene var detekterbare i området 0,1-5 ng/ml, uten at matrikseffekter ble funnet. Linearitet ble beregnet på to forskjellige måter ved validering. Linearitet som ble beregnet for hver respons fra analyttene ga kalibreringskurver med  $R^2$  på over 0,98. Linearitet som ble beregnet basert på gjennomsnittsverdier fra analyttene ga kalibreringskurver med  $R^2$  på over 0,99, noe som bidrar til svært nøyaktig kvantifisering av analyttene. Ekstraksjonsmetoden viste

også god spesifisitet i forhold til vanlige legemidler og rusmidler på markedet i Norge. Noe overdrag ble observert etter injeksjon av svært høye konsentrasjoner, og dette må man være oppmerksom på ved analyse av prøver for eksempel fra overdoser, der konsentrasjonene kan ligge langt utenfor måleområdet.

I denne oppgaven ble det vist at PALME gir effektiv prøveopparbeidelse for både basiske upolare substanser og benzodiazepiner. Metoden gir svært god opprensning, og PALME i kombinasjon med LC/MS-MS er godt egnet for bestemmelse av benzodiazepiner i fullblod. Den delvis automatiserte metoden oppnår en ytterligere reduksjon av analysetiden. Et tilleggsforsøk ble utført hvor ekstraksjonsmetoden benyttet til benzodiazepiner ble anvendt til ekstraksjon av basiske upolare substanser. Analyttene i ekstraktene var detekterbare, noe som tydet på at med en videre utvikling kan metoden være nyttig til påvisning av flere stoffgrupper i det rettsmedisinske laboratoriet i fremtiden.

Hittil har PALME blitt anvendt til analyse av et begrenset antall stoffgrupper og i relativt få bioanalytiske metoder. Sammenlignet med andre prøveopparbeidelsesmetoder, er PALME en mer kostnadseffektiv metode som gir rask og nøyaktig analyse. Imidlertid er den fremdeles en ny teknikk innenfor bioanalyse og for noen stoffer kan i tillegg uspesifikk binding av analytter til PVDF-membranen være en utfordring [6]. Det kreves følgelig flere studier for å kunne innføre PALME i rutineanalyse på moderne laboratoriet. Det er fortsatt mange ekstraksjonsparametere i PALME-systemet som kan testes og justeres for å tilpasse flere stoffgrupper, analyseteknikker og andre behov. I de kommende årene har PALME derfor et stort potensial til å bli en etablert ekstraksjonsteknikk benyttes for bioanalyse.

# Litteraturliste

1. Pilařová, V., Sultani, M., Ask, K.S., Nováková, L., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A., *One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction*. J. Chromatogr., B, 2017. **1043**: p. 25-32.
2. Roldán-Pijuán, M., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A., *Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma*. Anal. Bioanal. Chem., 2015. **407**(10): p. 2811-2819.
3. Vårdal, L., Askildsen, H.-M., Gjelstad, A., Øiestad, E.L., Edvardsen, H.M.E., and Pedersen-Bjergaard, S., *Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood*. J. Chromatogr., B, 2017. **1048**: p. 77-84.
4. Pedersen-Bjergaard, S., *Introduction*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-8.
5. Xu, R.N., Fan, L., Rieser, M.J., and El-Shourbagy, T.A., *Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2007. **44**(2): p. 342-355.
6. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., Parmer, M.P., and Pedersen-Bjergaard, S., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
7. Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., and Chavez-Eng, C.M., *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS*. Anal. Chem., 2003. **75**(13): p. 3019-3030.
8. Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., and Qiu, C., *Sample preparation*. J. Chromatogr., A, 2008. **1184**(1-2): p. 191-219.
9. Kole, P.L., Venkatesh, G., Kotecha, J., and Sheshala, R., *Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods*. Biomed. Chromatogr., 2011. **25**(1-2): p. 199-217.
10. Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., and Michotte, Y., *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*. J. Chromatogr., B, 2009. **877**(23): p. 2198-2207.
11. Nováková, L. and Vlčková, H., *A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation*. Anal. Chim. Acta, 2009. **656**(1-2): p. 8-35.
12. Saar, E., Gerostamoulos, D., Drummer, O.H., and Beyer, J., *Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood*. Anal. Bioanal. Chem., 2009. **393**(2): p. 727-734.
13. Ghambarian, M., Yamini, Y., and Esrafil, A., *Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications*. Mikrochim. Acta, 2012. **177**(3): p. 271-294.
14. Moosmann, B., King, L.A., and Auwärter, V., *Designer benzodiazepines: A new challenge*. World Psychiatry, 2015. **14**(2): p. 248-248.
15. Christophersen, A.S. and Mørland, J., *Frequent Detection of Benzodiazepines in Drugged Drivers in Norway*. Traffic. Inj. Prev., 2008. **9**(2): p. 98-104.
16. Folkehelseinstituttet, *Rusmidler i Norge 2016*. 2016: Statens institutt for rusmiddelforskning.

17. Blencowe, T., Raaska, K., and Lillsunde, P., *Benzodiazepines and sedative-hypnotics in blood of drivers under the influence and their association with other common illegal drug use and national sales figures*. *Ther. Drug Monit.*, 2011. **33**(1): p. 64-71.
18. Sauve, E.N., Langødegård, M., Ekeberg, D., and Øiestad, Å.M.L., *Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS*. *J. Chromatogr., B*, 2012. **883-884**: p. 177-188.
19. Mari, F., Defraia, B., Rensi, R., Gualco, B., Vaiano, F., and Bertol, E., *Fatal Poisoning due to Co-ingestion of Benzodiazepines and Alcohol: A Case Report*. *Indian J. Forensic Med. Toxicol.*, 2013. **7**(1): p. 45-47.
20. Smink, B.E., Brandsma, J.E., Dijkhuizen, A., Lusthof, K.J., Gier, J.J.d., Egberts, A.C.G., and Uges, D.R.A., *Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry*. *J. Chromatogr., B*, 2004. **811**(1): p. 13-20.
21. Bertol, E., Vaiano, F., Borsotti, M., Quercioli, M., and Mari, F., *Comparison of Immunoassay Screening Tests and LC-MS-MS for Urine Detection of Benzodiazepines and Their Metabolites: Results of a National Proficiency Test*. *J. Anal. Toxicol.*, 2013. **37**(9): p. 659-664.
22. Persona, K., Madej, K., Knihnicki, P., and Piekoszewski, W., *Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015. **113**: p. 239-264.
23. Wille, S.M., Raes, E., Lillsunde, P., Gunnar, T., Laloup, M., Samyn, N., Christophersen, A.S., Moeller, M.R., Hammer, K.P., and Verstraete, A.G., *Relationship between oral fluid and blood concentrations of drugs of abuse in drivers suspected of driving under the influence of drugs*. *Ther. Drug Monit.*, 2009. **31**(4): p. 511-9.
24. Karppi, J., Åkerman Kari, K., and Parviainen, M., *Suitability of Collection Tubes with Separator Gels for Collecting and Storing Blood Samples for Therapeutic Drug Monitoring (TDM)*, in *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2000. p. 313.
25. Espnes, K.A., Spigset, O., Delaveris, G.J.M., Mørland, J., and Smith-Kielland, A., *Bruk av hurtigtester for påvisning av rusmidler i urin*. *Tidsskrift for Den norske legeforening*, 2006. **126**(22): p. 57-60.
26. Hegstad, S., Oiestad, E.L., Johansen, U., and Christophersen, A.S., *Determination of benzodiazepines in human urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *J Anal Toxicol*, 2006. **30**(1): p. 31-7.
27. Oiestad, E.L., Johansen, U., Oiestad, A.M., and Christophersen, A.S., *Drug screening of whole blood by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Anal Toxicol*, 2011. **35**(5): p. 280-93.
28. Cudjoe, E. and Pawliszyn, J., *A new approach to the application of solid phase extraction disks with LC-MS/MS for the analysis of drugs on a 96-well plate format*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009. **50**(4): p. 556-562.
29. Valen, A., Leere Øiestad, Å.M., Strand, D.H., Skari, R., and Berg, T., *Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS*. *Drug Test Anal.*, 2016: p. In Press.
30. Zweigenbaum, J., Heinig, K., Steinborner, S., Wachs, T., and Henion, J., *High-throughput bioanalytical LC/MS/MS determination of benzodiazepines in human urine: 1000 samples per 12 hours*. *Anal. Chem.*, 1999. **71**(13): p. 2294-300.

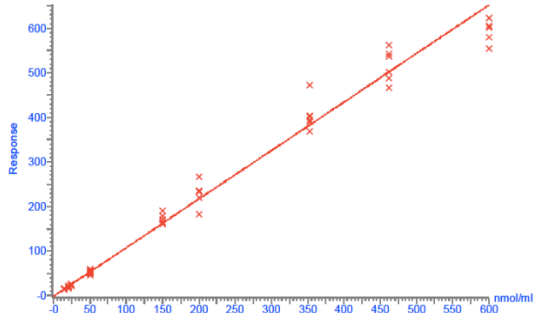
31. De Boeck, M., Missotten, S., Dehaen, W., Tytgat, J., and Cuypers, E., *Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction procedure combined with LC–MS/MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood*. *Forensic Sci. Int.*, 2017. **274**: p. 44-54.
32. Nazaripour, A., Yamini, Y., Ebrahimpour, B., and Fasihi, J., *Automated hollow-fiber liquid-phase microextraction followed by liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of benzodiazepine drugs in biological samples*. *Journal of Separation Science*, 2016. **39**(13): p. 2595-2603.
33. Høiseth, G., Tuv, S.S., and Karinen, R., *Blood concentrations of new designer benzodiazepines in forensic cases*. *Forensic Sci. Int.*, 2016. **268**: p. 35-38.
34. Moosmann, B., Bisel, P., Franz, F., Huppertz, L.M., and Auwärter, V., *Characterization and in vitro phase I microsomal metabolism of designer benzodiazepines — an update comprising adinazolam, cloniprazepam, fonazepam, 3-hydroxyphenazepam, metizolam and nitrazolam*. *J. Mass Spectrom.*, 2016. **51**(11): p. 1080-1089.
35. Chiu, M.L., Lawi, W., Snyder, S.T., Wong, P.K., Liao, J.C., and Gau, V., *Matrix Effects—A Challenge toward Automation of Molecular Analysis*. *J. Assoc. Lab. Autom.*, 2010. **15**(3): p. 233-242.
36. Hansen, S.H., *Biological Samples: Their Composition and Properties, and Their Collection and Storage*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals*, Steen Honoré Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd. p. 23-30.
37. Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D.M., Lu, Z., and Mazzeo, J.R., *Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses*. *J. Chromatogr., B*, 2007. **852**(1–2): p. 22-34.
38. Pedersen-Bjergaard, S. and Rasmussen, K.E., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
39. Ho, T.S., Pedersen-Bjergaard, S., and Rasmussen, K.E., *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: Comparison with conventional liquid–liquid extraction*. *J. Chromatogr., A*, 2002. **963**(1–2): p. 3-17.
40. Pedersen-Bjergaard, S., Gjelstad, A., and Halvorsen, T.G., *Sample Preparation*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd. p. 73-122.
41. Sharifi, V., Abbasi, A., and Nosrati, A., *Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction techniques in analytical toxicology*. *J. Food Drug Anal.*, 2016. **24**(2): p. 264-276.
42. Gjelstad, A. and Pedersen-Bjergaard, S., *Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions*. *Sci. Chromatogr.*, 2013. **5**(3): p. 181-189.
43. Ask, K.S., Bardakci, T., Parmer, M.P., Halvorsen, T.G., Øiestad, E.L., Pedersen-Bjergaard, S., and Gjelstad, A., *Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma*. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016. **129**: p. 229-236.
44. Hansen, S.H. and Reubsaet, L., *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS)*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals*, Steen Honoré Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons, Ltd. p. 123-172.

45. Van De Steene, J.C. and Lambert, W.E., *Comparison of matrix effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS analysis of nine basic pharmaceuticals in surface waters*. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2008. **19**(5): p. 713-718.
46. Lundanes, E., *Chromatography : Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. 2013, Weinheim: Wiley-VCH.
47. Verplaetse, R., Cuypers, E., and Tytgat, J., *The evaluation of the applicability of a high pH mobile phase in ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in urine and blood*. J. Chromatogr., A, 2012. **1249**: p. 147-154.
48. Mørland, J., *Rusmidler*. Store medisinske leksjon, 2009.
49. Christophersen, A.S., Gjerde, H., and Ystrøm, E., *Alkohol og andre rusmiddel*. Folkehelseinstituttet, 2016.
50. Folkehelseinstituttet, *Funn i blodprøver hos bilførere mistenkt for påvirket kjøring 2015*. 2016, Oslo: Folkehelseinstituttet.
51. Oslo universitetssykehus. *Trafikkulykker og rusmidler*. 05.01.2017; Available from: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rettsmedisinske-fag/alkohol-og-rusmidler/trafikkulykker-og-rusmidler>.
52. Huppertz, L.M., Bisel, P., Westphal, F., Franz, F., Auwärter, V., and Moosmann, B., *Characterization of the four designer benzodiazepines clonazolam, deschloroetizolam, flubromazolam, and meclonazepam, and identification of their in vitro metabolites*. Forensic Toxicol., 2015. **33**(2): p. 388-395.
53. Niwa, T., Shiraga, T., Ishii, I., Kagayama, A., and Takagi, A., *Contribution of Human Hepatic Cytochrome P450 Isoforms to the Metabolism of Psychotropic Drugs*. Biol. Pharm. Bull., 2005. **28**(9): p. 1711-1716.
54. Storhaug, L.W., Enger, A., Hjelmeland, K., Øiestad, E.L., and Vindenes, V., *Prolonged excretion of 7-aminoclonazepam in urine after repeated ingestion of clonazepam: A case report*. Forensic Sci. Int., 2012. **222**(1-3): p. e33-e35.
55. Mellingsæter, T.C., Bramness, J.G., and Slørdal, L., *Er z-hypnotika bedre og tryggere sovemedisiner enn benzodiazepiner?* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2006. **126**(2): p. 954-6.
56. Mørland, J., *Sentralstimulerende midler*. Store norske leksikon, 2009.
57. Krabseth, H.M., Tuv, S.S., Strand, M.C., Karinen, R.A., Wiik, E., Vevelstad, M.S., Westin, A.A., Øiestad, E.L., and Vindenes, V., *Nye psykoaktive stoffer*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2016. **136**(71): p. 4-7.
58. Parks, C., McKeown, D., and Torrance, H.J., *A review of ethylphenidate in deaths in east and west Scotland*. Forensic Sci. Int., 2015. **257**: p. 203-208.
59. Maskell, P.D., Smith, P.R., Cole, R., Hikin, L., and Morley, S.R., *Seven fatalities associated with ethylphenidate*. Forensic Sci. Int. **265**: p. 70-74.
60. Li, Q., Man Chan, W., Rudd, J.A., Mei Wang, C., Lam, P.Y.H., Mun Wai, M.S., Wood, D.M., Dargan, P.I., and Yew, D.T., *Chapter 12 - Ketamine*, in *Novel Psychoactive Substances*. 2013, Academic Press: Boston. p. 285-316.
61. Chem Axon. Available from: <https://chemicalize.com/>.
62. Hendriks, G., Uges, D.R.A., and Franke, J.P., *pH adjustment of human blood plasma prior to bioanalytical sample preparation*. J. Pharm. Biomed. Anal., 2008. **47**(1): p. 126-133.
63. Committee for Medicinal Products for Human Use, *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency, 2011.

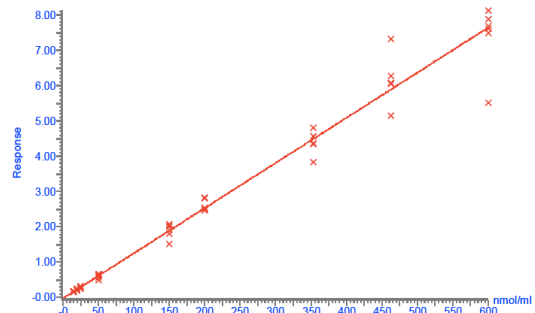
# Vedlegg

## Vedlegg 1: Kalibreringskurvene for benzodiazepiner og z-hypnotika (beregnet for hver respons).

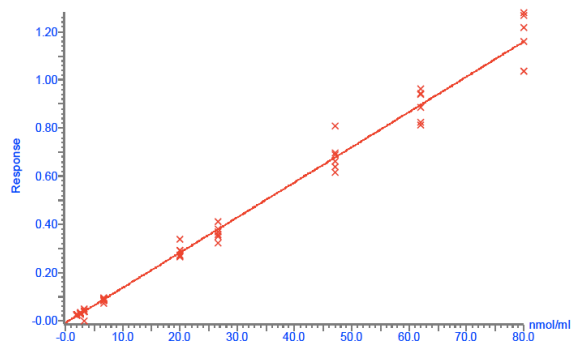
Compound name: alprazolam  
Correlation coefficient:  $r = 0.994559$ ,  $r^2 = 0.989148$   
Calibration curve:  $1.08922 * x + -1.312$   
Response type: Internal Std ( Ref 23 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



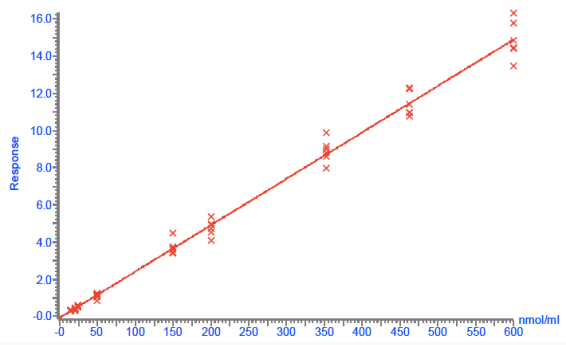
Compound name: bromazepam  
Correlation coefficient:  $r = 0.993393$ ,  $r^2 = 0.986830$   
Calibration curve:  $0.012769 * x + -0.0143762$   
Response type: Internal Std ( Ref 21 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



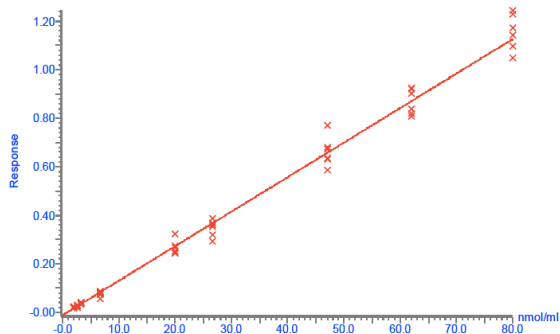
Compound name: Deskloretizolam  
Correlation coefficient:  $r = 0.994862$ ,  $r^2 = 0.989751$   
Calibration curve:  $0.0146125 * x + -0.0094961$   
Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



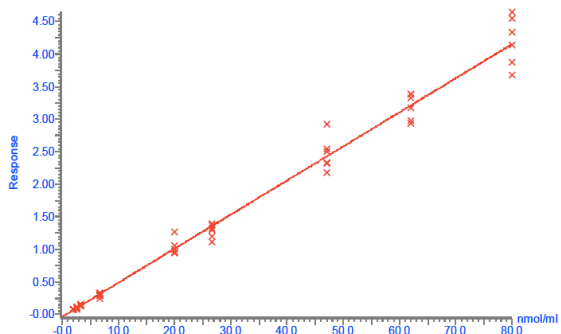
Compound name: diazepam  
Correlation coefficient:  $r = 0.996839$ ,  $r^2 = 0.993687$   
Calibration curve:  $0.024954 * x + -0.0830124$   
Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



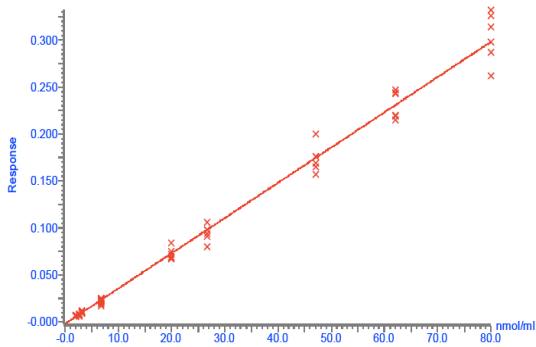
Compound name: Diklazepam  
Correlation coefficient:  $r = 0.996069$ ,  $r^2 = 0.992154$   
Calibration curve:  $0.0142229 * x + -0.0111146$   
Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



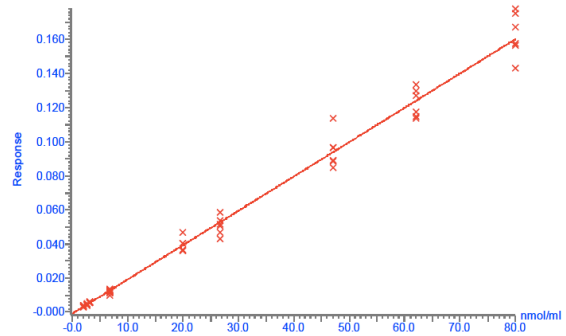
Compound name: Etizolam  
Correlation coefficient:  $r = 0.995464$ ,  $r^2 = 0.990949$   
Calibration curve:  $0.0523974 * x + -0.0367851$   
Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None



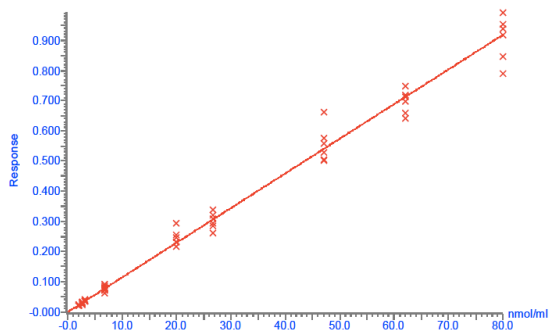
Compound name: fenazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.996082$ ,  $r^2 = 0.992180$   
 Calibration curve:  $0.00374912 * x + -0.00207283$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



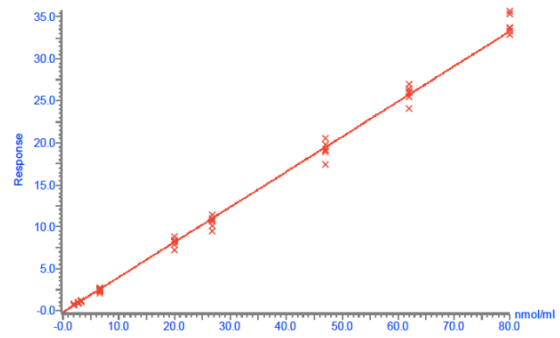
Compound name: Flubromazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.995506$ ,  $r^2 = 0.991032$   
 Calibration curve:  $0.00201163 * x + -0.000812734$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



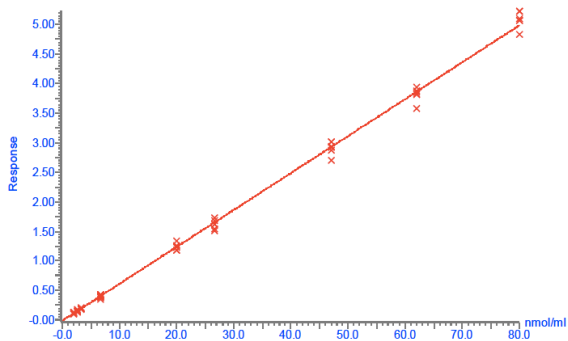
Compound name: Flubromazolam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.995302$ ,  $r^2 = 0.990626$   
 Calibration curve:  $0.0114888 * x + -0.000652755$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



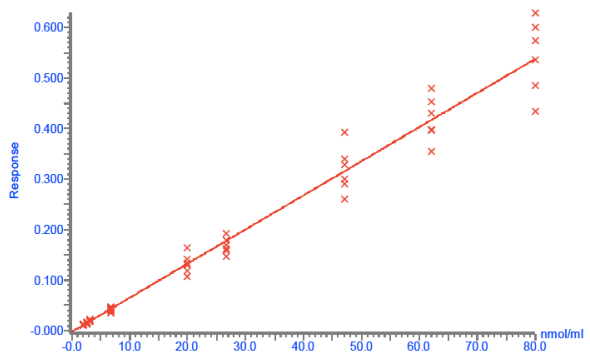
Compound name: flunitrazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998449$ ,  $r^2 = 0.996901$   
 Calibration curve:  $0.418816 * x + -0.209281$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: klonazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999012$ ,  $r^2 = 0.998026$   
 Calibration curve:  $0.0625116 * x + -0.0115467$   
 Response type: Internal Std ( Ref 26 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

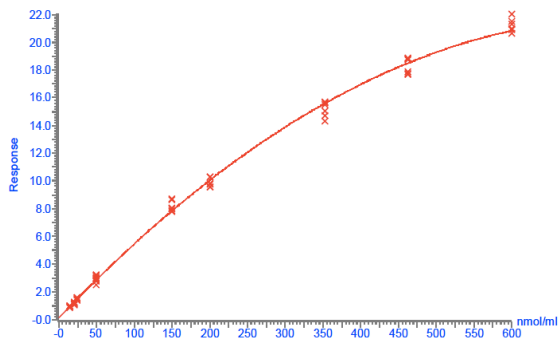


Compound name: Klonazolam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.991492$ ,  $r^2 = 0.983057$   
 Calibration curve:  $0.00675347 * x + -0.00224572$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

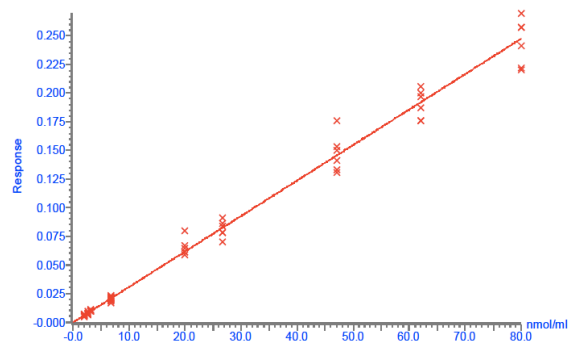




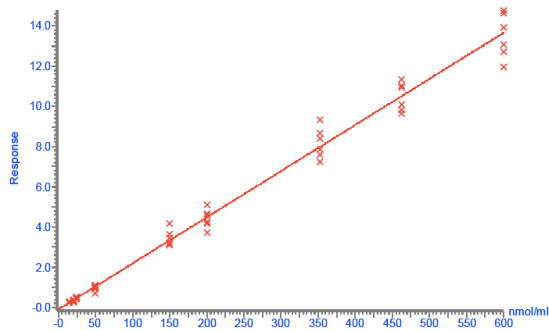
Compound name: lorazepam  
 Coefficient of Determination:  $R^2 = 0.996780$   
 Calibration curve:  $-3.79451e-005 * x^2 + 0.0573244 * x + 0.10193$   
 Response type: Internal Std ( Ref 24 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: 2nd Order, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



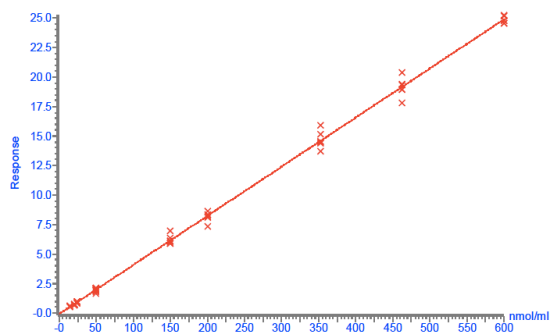
Compound name: Meklonazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.995176$ ,  $r^2 = 0.990375$   
 Calibration curve:  $0.0031019 * x + -0.000352857$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



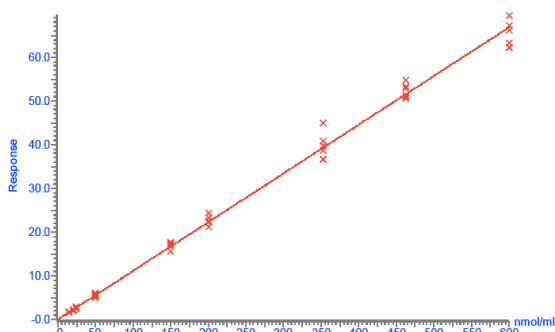
Compound name: midazolam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.995482$ ,  $r^2 = 0.990984$   
 Calibration curve:  $0.0229346 * x + -0.0986498$   
 Response type: Internal Std ( Ref 28 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



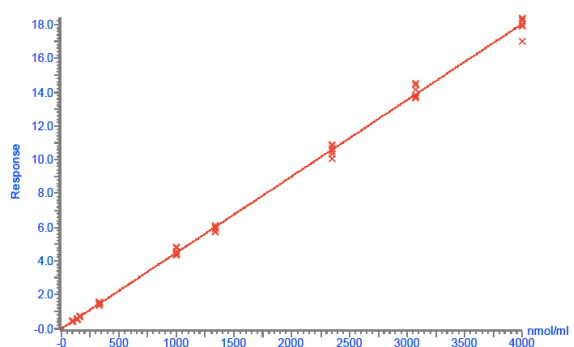
Compound name: N-desmethyldiazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998885$ ,  $r^2 = 0.997771$   
 Calibration curve:  $0.0416514 * x + -0.0940295$   
 Response type: Internal Std ( Ref 27 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



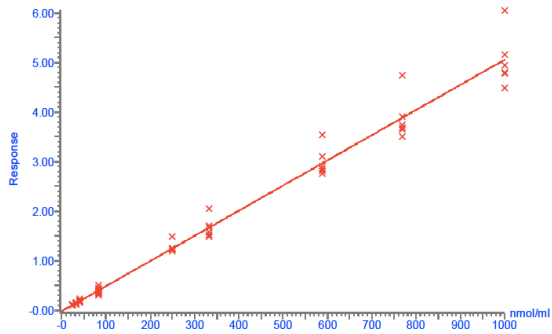
Compound name: nitrazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.998306$ ,  $r^2 = 0.996615$   
 Calibration curve:  $0.111475 * x + 0.00189883$   
 Response type: Internal Std ( Ref 21 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



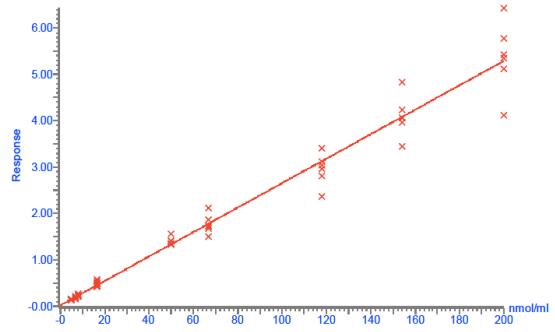
Compound name: oksazepam  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999419$ ,  $r^2 = 0.998839$   
 Calibration curve:  $0.00451828 * x + -0.0214549$   
 Response type: Internal Std ( Ref 25 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: Zolpidem  
Correlation coefficient:  $r = 0.993526$ ,  $r^2 = 0.987093$   
Calibration curve:  $0.00508044 * x + -0.0239075$   
Response type: Internal Std ( Ref 30 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None

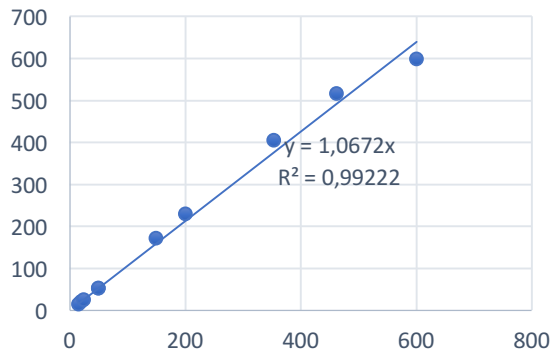


Compound name: Zopiklon  
Correlation coefficient:  $r = 0.991543$ ,  $r^2 = 0.983158$   
Calibration curve:  $0.0263776 * x + 0.0171223$   
Response type: Internal Std ( Ref 29 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting:  $1/x$ , Axis trans: None

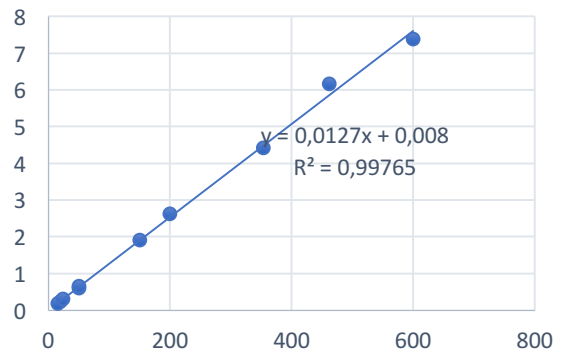


**Vedlegg 2: Kalibreringskurvene for benzodiazepiner og z-hypnotika (beregnet for gjennomsnittsverdi).**

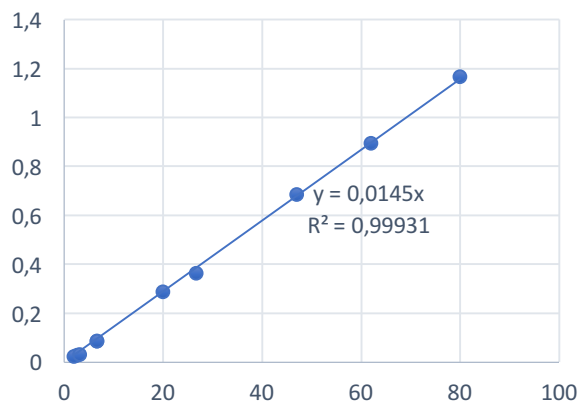
**Alprazolam**



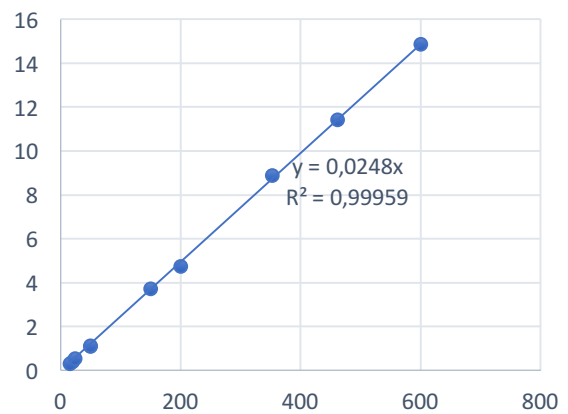
**Bromazepam**



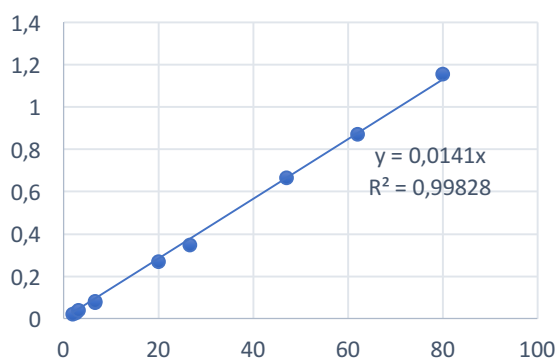
**Deskloretizolam**



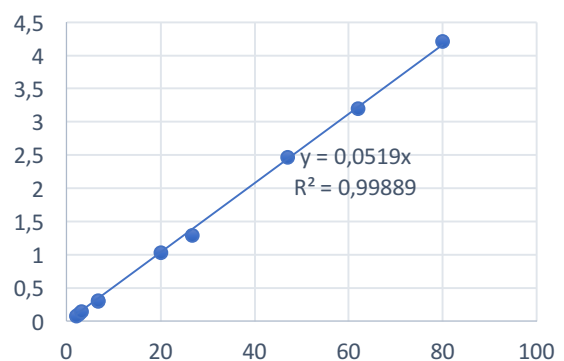
**Diazepam**



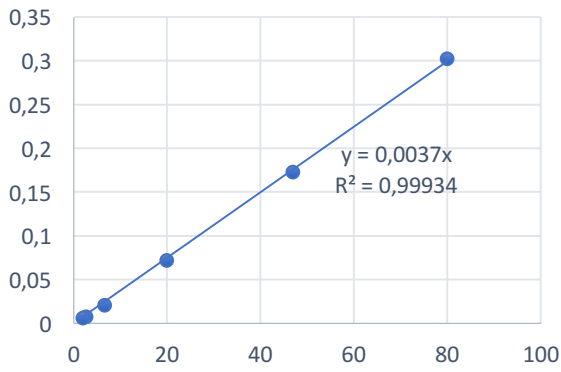
**Diklazepam**



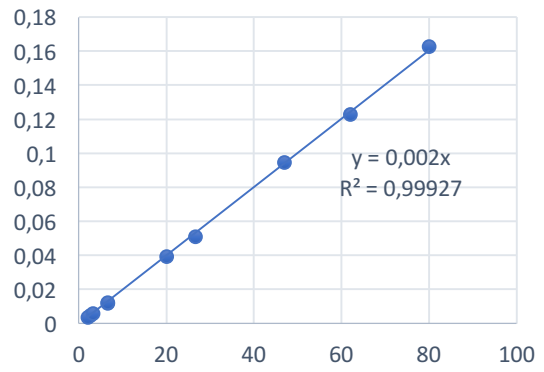
**Etizolam**



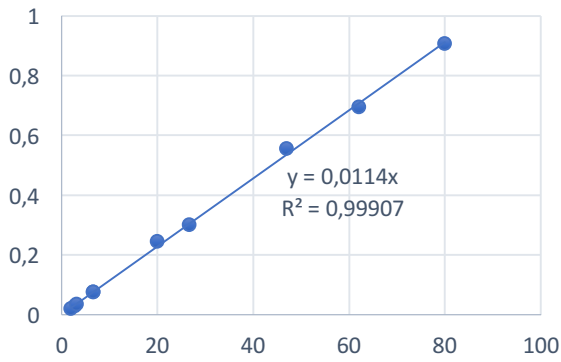
### Fenazepam



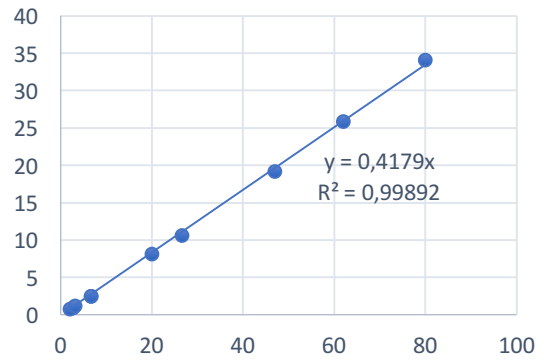
### Flubromazepam



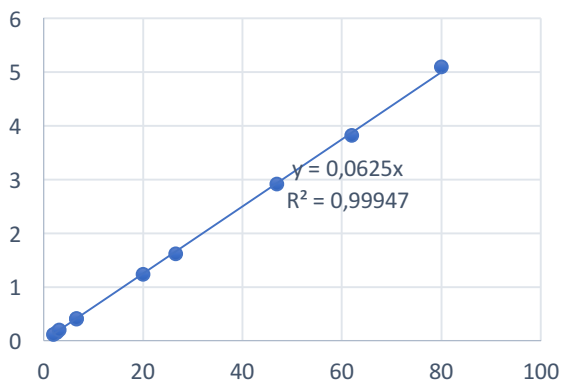
### Flubromazolam



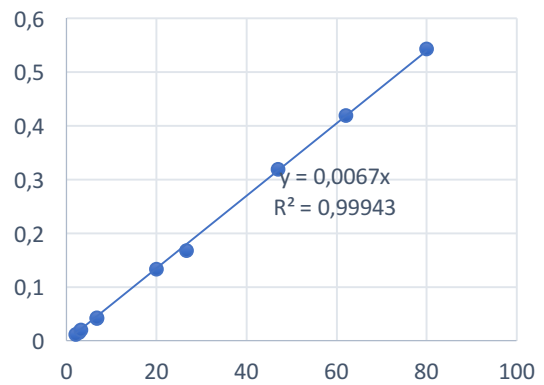
### Flunitrazepam



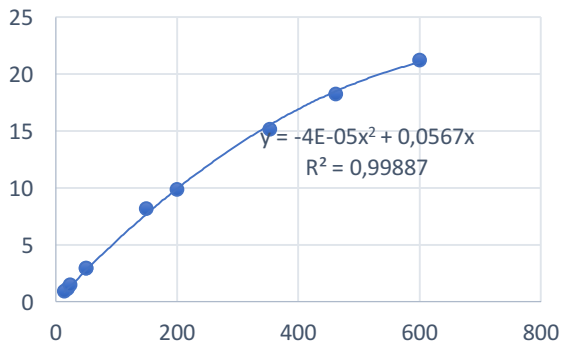
### Klonazepam



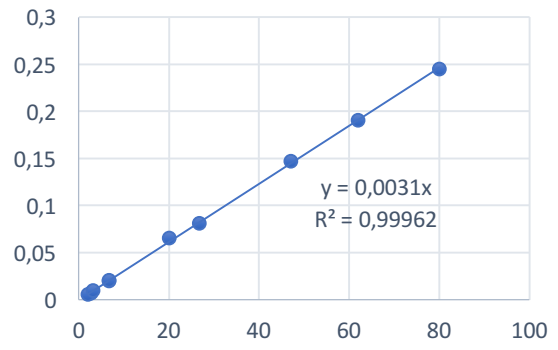
### Klonazolam



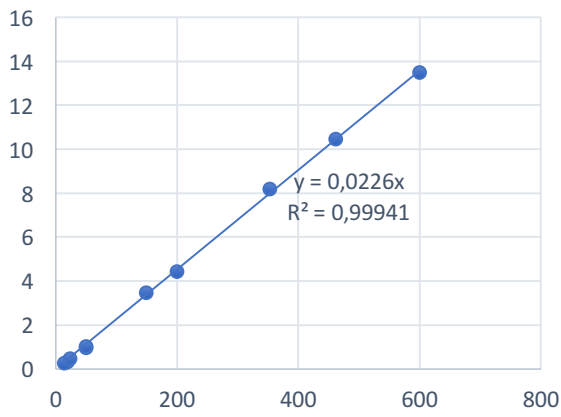
### Lorazepam



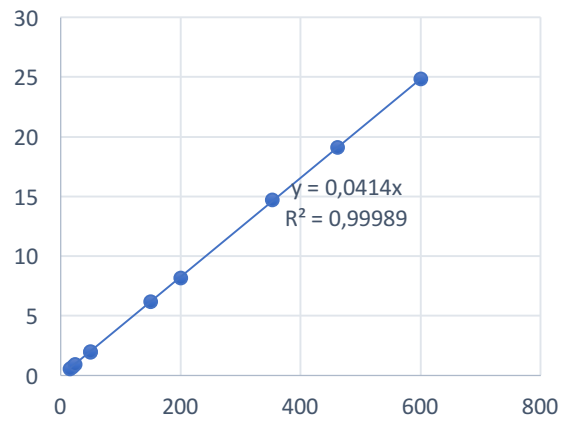
### Meklonazepam



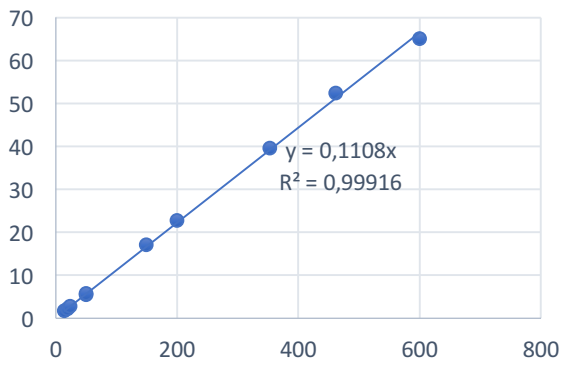
### Midazolam



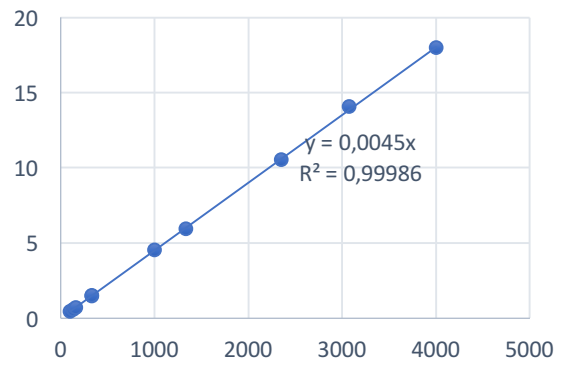
### N-desmetyldiazepam



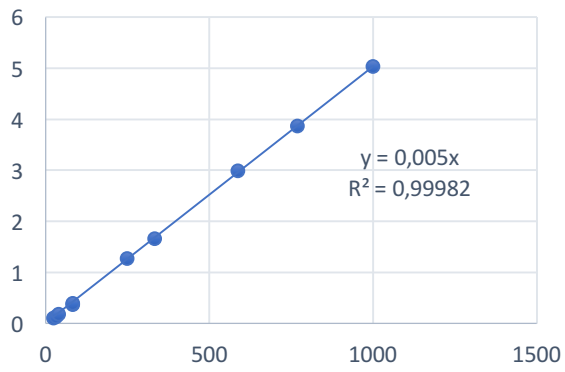
### Nitrazepam



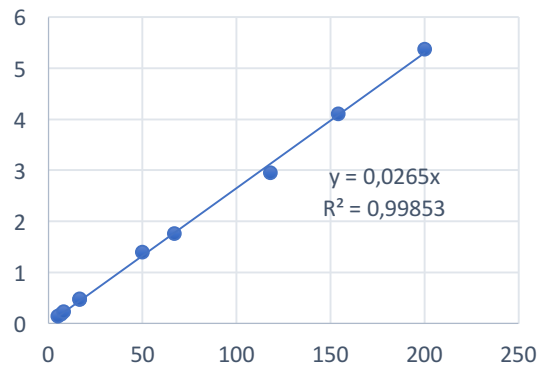
### Oksazepam



### Zolpidem



### Zopiklon



**Vedlegg 3: LOD og LOQ for benzodiazepiner.**

<b>Forbindelse</b>	<b>LOD (ng/ml)</b>	<b>LOQ (ng/ml)</b>
<b>Alprazolam</b>	0,75	24
<b>Bromazepam</b>	0,75	24
<b>Deskloretizolam</b>	0,10	3,2
<b>Diazepam</b>	0,75	24
<b>Diklazepam</b>	0,10	3,2
<b>Etizolam</b>	0,10	3,2
<b>Fenazepam</b>	0,20	3,2
<b>Flubromazepam</b>	0,20	3,2
<b>Flubromazolam</b>	0,10	3,2
<b>Flunitrazepam</b>	0,10	3,2
<b>Klonazepam</b>	0,20	3,2
<b>Klonazolam</b>	0,10	3,2
<b>Lorazepam</b>	1,50	24
<b>Meklonazepam</b>	0,20	3,2
<b>Midazolam</b>	0,75	24
<b>N-desmetyldiazepam</b>	0,75	24
<b>Nitrazepam</b>	0,75	24
<b>Oksazepam</b>	5,0	160
<b>Zolpidem</b>	1,25	40
<b>Zopiklon</b>	0,25	8,0

**Vedlegg 4: Prosesseffektivitet for benzodiazepiner og z-hypnotika.**

<b>Forbindelse</b>	<b>Kontroll 1*</b> <b>n=6</b>	<b>Kontroll 2</b> <b>n=6</b>	<b>Kontroll 3</b> <b>n=6</b>	<b>Kontroll 4</b> <b>n=6</b>
<b>Alprazolam</b>	98 %	59 %	56 %	70 %
<b>Bromazepam</b>	115 %	73 %	72 %	72 %
<b>Deskloretizolam</b>	124 %	73 %	67 %	67 %
<b>Diazepam</b>	124 %	93 %	87 %	86 %
<b>Diklazepam</b>	127 %	102 %	96 %	91 %
<b>Etizolam</b>	137 %	84 %	78 %	76 %
<b>Fenazepam</b>	129 %	102 %	108 %	98 %
<b>Flubromazepam</b>	147 %	109 %	102 %	98 %
<b>Flubromazolam</b>	115 %	62 %	62 %	63 %
<b>Flunitrazepam</b>	122 %	97 %	95 %	98 %
<b>Klonazepam</b>	133 %	99 %	102 %	102 %
<b>Klonazolam</b>	104 %	54 %	53 %	52 %
<b>Lorazepam</b>	134 %	77 %	85 %	93 %
<b>Meklonazepam</b>	150 %	105 %	101 %	102 %
<b>Midazolam</b>	141 %	97 %	94 %	92 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	131 %	97 %	95 %	92 %
<b>Nitrazepam</b>	131 %	97 %	97 %	96 %
<b>Oksazepam</b>	127 %	71 %	70 %	71 %
<b>Zolpidem</b>	141 %	74 %	65 %	65 %
<b>Zopiklon</b>	384 %	59 %	63 %	73 %

*\*Pga. stort avvik fra andre kontroller ble ikke resultatet for kontroll 1 tatt med i vurdering.*



**Vedlegg 5: Matrikseffekter av benzodiazepiner (korrigert mot internstandard) i prosent.**

<b>Forbindelse</b>	<b>Kontroll 1</b>	<b>Kontroll 2</b>	<b>Kontroll 3</b>	<b>Kontroll 4</b>
	<b>n=6</b>	<b>n=6</b>	<b>n=6</b>	<b>n=6</b>
<b>Alprazolam</b>	99 %	98 %	102 %	105 %
<b>Bromazepam</b>	104 %	107 %	106 %	102 %
<b>Deskloretizolam</b>	92 %	99 %	96 %	96 %
<b>Diazepam</b>	98 %	101 %	98 %	97 %
<b>Diklazepam</b>	99 %	103 %	102 %	98 %
<b>Etizolam</b>	95 %	99 %	99 %	98 %
<b>Fenazepam</b>	93 %	98 %	106 %	100 %
<b>Flubromazepam</b>	102 %	107 %	101 %	99 %
<b>Flubromazolam</b>	92 %	94 %	96 %	93 %
<b>Flunitrazepam</b>	96 %	96 %	98 %	98 %
<b>Klonazepam</b>	103 %	98 %	101 %	99 %
<b>Klonazolam</b>	102 %	102 %	101 %	99 %
<b>Lorazepam</b>	94 %	94 %	100 %	104 %
<b>Meklonazepam</b>	107 %	105 %	98 %	100 %
<b>Midazolam</b>	95 %	96 %	97 %	96 %
<b>N-desmetyldiazepam</b>	99 %	99 %	99 %	98 %
<b>Nitrazepam</b>	100 %	98 %	99 %	100 %
<b>Oksazepam</b>	99 %	100 %	99 %	97 %
<b>Zolpidem</b>	94 %	98 %	95 %	92 %
<b>Zopiklon</b>	99 %	100 %	95 %	95 %

**Vedlegg 6: Stoffene som ble inkludert i spesifisitetstesten.**

<b>Forbindelse</b>	<b>Konsentrasjon i blod (µM)</b>	<b>Forbindelse</b>	<b>Konsentrasjon i blod (µM)</b>
Morfin	4	MBDB	5
Kodein	4	4-MEC	5
Etylmorfin	25	2,5-DMA	5
Oksykodon	6	2C-C	5
Fentanyl	0,4	2C-I	5
Amfetamin	38	2C-T-2	5
Metamfetamin	38	2C-E	5
MDMA	38	2C-T-7	5
Tramadol	63	2C-P	5
Kokain	15	2C-B*	5
Metylfenidat	3	25C-NBOMe*	5
THC	1	25C-NBOH	5
LSD	0	25I-NBOMe*	5
Ketamin	38	25B-NBOMe*	5
Citalopram	8	25H-NBOMe	5
Mirtazapin	8	25G-NBOMe*	1
Venlafaksin	8	DOI*	5
Paroxetin	8	DOC	5
Sertralin	8	3-MMC	5
Fluoxetin	8	3,4-CTMP	5
Duloxetin	8	4-CMC*	5
Mianserin	8	Pentedron*	5
Nortryptilin	8	Metylon*	5
Amitryptilin	8	5-EAPD	5
Trimipramin	8	MET	5
Klomipramin	8	6-APDB	5
Doxepin	8	MDPV	5
Hydroksybupropion	8	mCPP	5
Vareniklin	8	p-metyl-4-aminoreks	5
Haloperidol	2	4-isopropylfenidat	5
Proklorperazin	4	Difenidin	5
Aripiprazol	4	Alfa-metyltryptamin*	5
Levomepromazin	8	Desomorfin*	5
Quetiapin	8	Metoxetamin*	5
Klozapin	17	Etylkatinon*	5
Zuklopentixol	4	Bromo-Dragonfly*	5
Risperidon	4	Dimetokain*	5
9-OH-risperidon	4	5-IT*	5

Olanzapin	8	Xylazin*	5
Klorprotixen	8	Etylfenidat*	5
Prometazin	17	N,N-dimetyl-MDA*	5
Ketobemidon	4	2-MMC*	5
O-desmetyltramadol	17	AH-7921*	5
Petidin	33	Tapentadol*	5
Deksklorfeniramin	4	Metiopropamin*	5
Alimemazin	4	Carfentanyl*	5
Norpropoxyfen	42	2-AI*	5
Hydroksyzin	17	5-APB*	5
Lamotrigin	17	2-DPMP	5
Karbamazepin	67	MT-45*	5
10-OH-karbazepin	83	DMAA*	5
Gabapentin	167	3-MeO-PCP*	5
Paracetamol	333	5-MeO-DIPT*	5
Fenazon	67	Fenmetrazin	5
Klometiazol	417	5-MeO-DMT	5
Baklofen	83	Ibogain*	5
Diltiazem	8	bk-MDEA*	5
Metoprolol	42	4-bromometkatinon*	5
Propranolol	42	4-OH-MET*	5
7-aminoflunitrazepam	2	Dimetokain*	5
7-aminonitrazepam	8	Camfetamin*	5
7-aminoklonazepam	8	PV8*	5
Teofyllin	797	PV9*	5
Salicylsyre	333	Alfa-PVP	5
Fenytoin	100	Alfa-PVT	5
Ibuprofen	233	Alfa-PHP*	5
Fenobarbital	167	Alfa-PBP*	1
Pentobarbital	13	3F-fenmetrazin*	1
Tiopental	133	4-AcO-DIPT*	1
Metaoxedrin	5	2-fluoramfetamin*	5
Homoamfetamin	5	3-fluoramfetamin	5
Harmin	5	4-fluoroamfetamin	5
MDAI	5	4-metylamfetamin*	5
Dimetyltryptamin	5	4-metyltioamfetamin*	5
bk-MDDMA	5	2-fluormetamfetamin	5
bk-MBDB	5	3-fluormetamfetamin*	5
N-OH-MDA	5	4-fluormetamfetamin*	5

<b>Salvinorin A</b>	5	<b>4-metylmfetamin*</b>	5
<b>BDB</b>	5	<b>Nifoxipam</b>	1
<b>6-APB</b>	5		

\* Spesifisiteten for disse stoffene ble ikke vurdert for deskloretizolam, da stoffet også var i blandingen.



UiO : Universitetet i Oslo

# Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction of benzodiazepines from whole blood

Gladys Wong<sup>1</sup>, Linda Vårdal<sup>1</sup>, Stig Pedersen-Bjergaard<sup>1</sup>, Elisabeth Leere Øiestad<sup>1,2</sup>, Astrid Gjelstad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, University of Oslo, Oslo, Norway

<sup>2</sup>Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

## Introduction

In this project a new extraction method – Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME), was investigated for the potential screening of benzodiazepines in whole blood.

### Benzodiazepines as abused drugs

Benzodiazepines are known as tranquilizers which belong to the most commonly prescribed medications worldwide, and also to the most commonly abused pharmaceuticals [1].

### What is PALME?

PALME represents a new concept in microextraction, with a supported liquid membrane (SLM) incorporated in a 96-well plate system. The PALME set-up includes a donor plate, an acceptor plate and a top lid (Figure 1). The SLM is immobilized by capillary force in the porous polyvinylidene florid (PVDF) membrane.

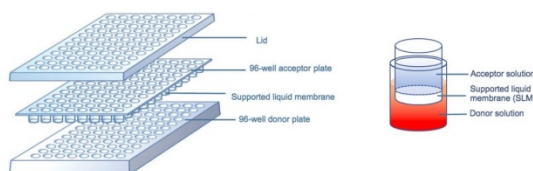


Figure 1: Parallel artificial liquid membrane extraction set-up. Left [2]: Donor plate (sample), acceptor plate with SLM at the bottom, and a lid to prevent evaporation. Right: Overview of one extraction well.

## Principle and "proof of concept"

Mass transfer of analytes is promoted by a pH gradient between acceptor solution and donor solution. Analytes dissolve into organic SLM unchanged, and further to acceptor solution as protonated species (Figure 2). The aqueous acceptor solution is directly compatible with LC-MS/MS.

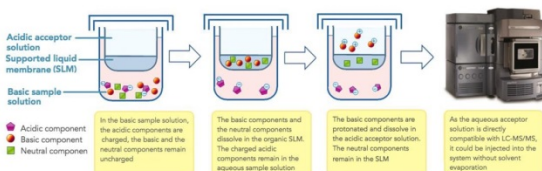


Figure 2: Extraction process of PALME.

## Goal

Protonation and deprotonation are essential for diffusion through the SLM. Thus, the analytes of interest for PALME have primarily been drugs with basic or acidic character. In this respect, extraction of benzodiazepines is a challenge due to their low basic pKa values (Table 1).

## Methods

Ten representative substances (Table 1) were chosen for evaluation. Important operational parameters for PALME were optimized, including composition of acceptor solution, volume of acceptor solution, composition of organic solvent in SLM, pH value of sample solution and extraction time.

A Waters Acquity UPLC module was used for separation. Gradient elution was performed on an Acquity HSS T3 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) from Waters. Gradient elution with methanol and 10 mM ammonium formate buffer pH 3.1 as solvents, was used. ESI-MS/MS-detection was performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode using positive ionization and two transitions for each compound with a Waters TQS tandem mass spectrometer.

## References

- S.J. Salomone Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology Humana Press, Inc., Totowa, NJ (2001)
- Gjelstad A; Rasmussen KE; Parmer MP; Pedersen-Bjergaard S. Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format. *Bioanalysis* Vol.5(11), p.1377-1385 (2013)

Table 1: pKa values, log P values for the benzodiazepines and extraction performance (n=4) from whole blood.

Compound	Basic pKa	Log P	Recovery (%)	RSD (%)
Diazepam	2.9	3.1	74	3
Clonazepam	1.9	3.2	102	3
N-desmethyldiazepam	2.9	3.2	93	3
Fenazepam	2.1	4.3	94	4
Oxazepam	-1.5	2.9	56	4
Flunitrazepam	1.7	2.6	102	2
Nitrazepam	2.7	2.6	94	3
7-aminoflunitrazepam	3.8	1.8	20	6
Zolpidem	5.4	3.0	42	2
Alprazolam	5.0	3.0	43	3

## Results

A major increase in recovery was seen by modification of the composition of the acceptor solution, and the solvent for SLM.

### Modification of acceptor solution

The original acceptor solution (HCOOH 200 mM) was modified with dimethyl sulfate oxide (DMSO), as well as common organic solvents such as MeOH, EtOH and acetonitrile. The solvents were mixed separately with HCOOH 200 mM with various mixing ratios. Compared to the other solvents, DMSO had a significant impact on recoveries for most of the benzodiazepines (Figure 3).

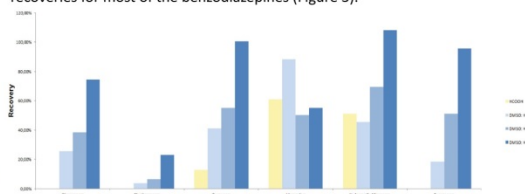


Figure 3: The effect of DMSO added to the acceptor solution with different mixing ratios.

### Modification of SLM

Seven organic solvents were tested for the SLM, which included bis(2-ethylhexyl) phosphite (DEHPI), dodecyl acetate, dihexyl ether, undecanol, isopentylbenzene, hexadecane and undecanone with 1 % trioctylamine (w/w). Best results were found for undecanone and dihexyl ether. As some benzodiazepines preferred one solvent to another, a mixture with 1:1 mixing ratio were found to give the optimal result.

Other parameters such as extraction time, volume of acceptor solution and pH value of sample solutions were further optimized and provided further, although less substantial, increase in recoveries. Final experimental conditions are summarized in Table 2. The PALME extracts were analyzed by LC-MS/MS.

Table 2: Final experimental conditions

	Contents
Donor solution (250 μL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>100 μL whole blood</li> <li>130 μL phosphate buffer 50 mM (pH 7,5)</li> <li>20 μL intern standard</li> </ul>
Acceptor solution (100 μL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>75 μL DMSO</li> <li>25 μL HCOOH 200 mM</li> </ul>
SLM (3 μL)	Undecanone : dihexyl ether 1:1 with 1 % trioctylamine (w/w)
Extraction time	60 min

## Conclusion

All the benzodiazepines were successfully extracted from plasma and whole blood with satisfactory extraction performance. PALME has thus proven to achieve a high-throughput user-friendly system for benzodiazepines, in addition to substances with more acidic or basic characters. Due the practical 96-well format as well as low cost compared to e.g. protein precipitation plates, this method can be a good alternative in the field of forensic science.