

Bestemmelse av rusmidler i blod basert
på *Volumetric Absorptive
Microsampling, Parallel Artificial Liquid
Membrane Extraction* og
væskekromatografi-massespektrometri

Ingrid Oksavik Mestad



Masteroppgave i Farmasi
45 studiepoeng

Seksjon for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

Avdeling for rettsmedisinske fag
Oslo universitetssykehus

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2018

Bestemmelse av rusmidler i blod basert på *Volumetric Absorptive Microsampling, Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction* og væskekromatografi-massespektrometri

Masteroppgaven ble gjennomført i perioden august 2017-mai 2018 ved Faggruppe for Legemiddelanalyse, Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo og Avdeling for rettsmedisinske fag, Klinikk for laboratoriemedisin, Oslo Universitetssykehus.

Veiledere:

Elisabeth Leere Øiestad

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

Astrid Gjelstad

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

Stig Pedersen-Bjergaard

Professor, Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo
Professor, Det Farmaceutiske Fakultet, Københavns Universitet

© Ingrid Oksavik Mestad

2018

Bestemmelse av rusmidler i blod basert på *Volumetric Absorptive Microsampling, Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction* og væskekromatografi-massespektrometri

Ingrid Oksavik Mestad

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Det ble i dette arbeidet optimalisert ekstraksjonsbetingelser for 18 rusmidler med ekstraksjonsteknikken *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME). Prøvetakingsmetoden *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS) ble testet ut i kombinasjon med PALME for første gang, og metoden ble validert. Repertoaret dekker de vanligste stoffgruppene som analyseres for å vurdere påvirket kjøring, slik som amfetaminer, kokain, opioider, benzodiazepiner, og benzodiazepinlignende stoffer. Stoffene utgjorde et bredt spekter av legemidler og rusmidler med ulike kjemiske egenskaper. Polariteten til stoffene varierte fra $\log P = 0,9$ for morfin til $5,9$ for THC. Virkestoffet i cannabis, THC, og opioidet buprenorfin viste seg vanskelig å inkludere i metoden. Morfin og buprenorfin var zwitterioner og representerte en gruppe analytter som var forventet å gi utfordringer i denne metoden.

PALME er en væske-fase mikroekstraksjonsmetode, som er utviklet fra *hollow-fiber liquid phase microextraction* (HF-LPME). Ekstraksjonsteknikken er utviklet på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Teknikken utføres i et 96-brønns format, og utgjør et trefasesystem hvor analyttene ekstraheres fra vandige prøver i en donorbrønn, over en organisk væskemembran, til en vandig akseptorløsning. Separasjonen av analytter og komponenter i prøveløsningen baseres på en pH-gradient, som dannes ved å justere pH i prøveløsningen og akseptorløsningen.

VAMS som prøvetakingsmetode kombinert med PALME, ble evaluert ved å sammenligne blodprøver applisert på VAMS med blod som ble pipettert direkte i PALME-platen. VAMS som prøvetakingsmetode gav lovende resultater med stort sett tilfredsstillende linearitet (R^2 -verdier fra 0,983–0,999), men med noe lavere presisjon. VAMS kombinert med PALME gav en effektiv prøveopparbeidelsesmetode, ved at «prøvesvampene» ble puttet direkte i en 96-brønnsplate og analyttene ble ekstrahert, uten forutgående eluering. I den optimaliserte PALME-metoden bestod donorløsningen av 185 μl 200 mM karbonatbuffer, 20 μl internstandard og 20 μl fullblod fra VAMS. Væskemembranen bestod av 4 μl undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA (w/w/w) og akseptorløsningen bestod av 100 μl DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v).

Validering av metoden inneholdt følgende parametere: Linearitet, innen- og mellom-serievariasjon, minste detekterbare og kvantifiserbare konsentrasjon (MDK og MKK),

ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, selektivitet og overdrag. For 17 av 20 stoffer var linearitet i overensstemmelse med EMA Guideline krav ($R^2=0.99$). For innen-serie-variasjon var %-RSD < 15 % for 16 av 20 stoffer, mens tilsvarende tall for mellom-serie-variasjon var åtte av 20 stoffer. Nøyaktigheten var innenfor ± 15 % for 18 av 20 stoffer. Minste kvantifiserbare konsentrasjon var i området 0,3–7,5 ng/ml for samtlige analytter. Ekstraksjonsutbyttene for de fleste analyttene var mellom 80 og 120 %. Matrikseffekter for analyttene var innenfor grensen på ± 20 % (80–120 %) for 17 av 20 stoffer. Det ble ikke observert overdrag i systemet etter injeksjon av analytt i høye konsentrasjoner.

Den validerte metoden ble brukt til å ekstrahere fullblodsprøver samlet til en veikantundersøkelse som ble utført for å følge med på utviklingen av rusmiddelbruk i trafikken på Østlandet. Blodprøvene oppsamlet med VAMS som prøvetakingsmetode, ble bekreftet negative for de 18 legemidlene og rusmidlene prøveopparbeidelse- og analysemetoden inkluderte. VAMS som prøvetakingsmetode viste seg i praksis utfordrende i veikanten ved at det var vanskelig å få ut nok blod til «prøvesvampen», og prøvetakingssteget må videre optimaliseres. I tillegg kan det være interessant å se på andre aktuelle bruksområder for VAMS innen rettsmedisinen.

PALME som ekstraksjonsteknikk gir flere fordeler som lavt løsemiddelforbruk, gode muligheter for oppkonsentrering, med et utstyr som er lett å håndtere, og som er kommersielt tilgjengelig. Teknikken er vist å gi rene ekstrakter, og kan potensielt automatiseres i større laboratorier. Metoden som ble utviklet viste lovende resultater, og mye av grunnlaget for en effektiv prøveopparbeidelsesmetode med VAMS og PALME er lagt. Noe videre arbeid kreves gjennomført før metoden potensielt kan brukes i et rutinelaboratorium. Dersom dette lar seg gjøre kan man potensielt spare tid, penger og arbeidskraft.

Forord

Jeg vil benytte muligheten til å takke alle som har stilt opp for meg gjennom studietiden, og ikke minst dette siste året.

Tusen takk til veilederne mine Elisabeth Leere Øiestad, Astrid Gjelstad og Stig Pedersen-Bjergaard for all god veiledning og støtte!

Elisabeth, takk for at du har utfordret og motivert meg i arbeidet, og for all god hjelp på lab, med oppgaveskriving og gode faglige samtaler. Takk for at du stiller opp uansett om du er på nabokontoret, på hytta (med fibernett), eller om du er på andre siden av kloden. Det har vært veldig kjekt og inspirerende å jobbe sammen med deg. Du er alle tiders!

Astrid, takk for god veiledning med oppgaven, og råd som du har gitt; du er en super veileder som både er tålmodig og pedagogisk. Takk også for all hjelp med dataprogrammer og Excel.

Stig, takk for at du tar deg tid til å sette deg inn i problemstillingene jeg kommer med, og hjelper med å finne en god løsning. Du gir kloke og gode råd, og har vært til stor hjelp i arbeidet.

Tusen takk til alle på Avdeling for legemiddelanalyse og alle på Avdeling for rettsstoksikologi, for all god hjelp, og for at dere har inkludert meg på en god måte.

Tusen takk til Camilla, Håkon, Sindre, Eirik og Areli som jeg har delt masterkontor med. Takk for at dere gjorde hverdagen bra, med mye tull; kortspill, hang man, spinnerkonkurranse og adventskalender. Men også takk for gode råd, faglige diskusjoner og støtte. Takk til studievenninnene mine, som jeg har kunnet dele gleder og sorger med gjennom hele studiet. Gleder meg til mange flere «studie-turer».

Tusen takk til kollektivet, som også er mine beste venner. Takk for at dere har tålt en rotete og litt ambivalent romkamerat, som spiser pesto og egg på kjøkkenet litt for tidlig på morgenen.

Tusen takk til mamma for at jeg kan ringe deg når jeg er sliten og lei, og få trøst. Takk for at du lytter til meg, og for verdens beste klemmer. Takk til pappa som alltid hjelper meg til å sortere og prioritere når jeg har for mange tanker i hodet eller valg å ta. Det er godt å vite at dere alltid er der for meg.

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	1
1 Innledning.....	4
1.1 Bakgrunn	4
1.2 Hensikt.....	6
2 Teori	7
2.1 Rusmidler.....	7
2.2 Mikrosampling av blodprøver	8
2.2.1 <i>Dried blood spots</i> (DBS).....	8
2.2.2 <i>Volumetric Absorptive Microsampling</i> (VAMS).....	9
2.3 Prøveopparbeidelse.....	9
2.3.1 Væske-væske-ekstraksjon	10
2.3.2 Væske-fase mikroekstraksjon	11
2.3.3 <i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>	12
2.4 Væskrokromatografi	14
2.4.1 Omvendt-fase kromatografi	15
2.4.2 <i>Ultra-high performance liquid chromatography</i> (UHPLC).....	16
2.5 Massespektrometri.....	18
2.5.1 Elektrosprayionisasjon (ESI).....	19
2.5.2 Masseanalytatorer	19
3 Materiale og metode.....	22
3.1 Karakteristikk av analytter.....	22
3.2 Utstyr	25
3.3 Kjemikalier	26
3.4 Løsninger.....	29
3.4.1 Stamløsninger.....	29
3.4.2 Arbeidsløsning	29
3.4.3 Standarder og kontroller.....	31
3.4.4 Fullblod	36
3.4.5 Organisk væskemembran	36
3.4.6 Mobilfaser	36
3.5 Instrumentelle betingelser.....	37
3.5.1 LC-ITMS	37
3.5.2 LC-QqQ.....	39
3.6 Utførelse av PALME	42
3.6.1 PALME fra vandige prøver.....	42
3.6.2 PALME fra fullblod	43
3.6.3 PALME ved validering og reelle prøver	44
3.7 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger.....	44
3.8 Optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver.....	47
3.8.1 <i>Volumetric Absorptive Microsampling</i>	50
3.9 Metodevalidering.....	51

3.9.1	Linearitet	51
3.9.2	Nøyaktighet og presisjon.....	51
3.9.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon.....	52
3.9.4	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK).....	52
3.9.5	Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet	52
3.9.6	Matrikseffekter	53
3.9.7	Selektivitet.....	53
3.9.8	Overdrag.....	54
3.10	Ekstraksjon av reelle prøver.....	54
3.11	Beregninger og formler.....	54
3.11.1	Ekstraksjonsutbytte	54
3.11.2	Prosesseffektivitet	54
3.11.3	Matrikseffekter	55
3.11.4	Nøyaktighet	55
3.11.5	Presisjon	55
4	Resultat og diskusjon	56
4.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger.....	56
4.2	Optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver.....	63
4.2.1	Volumetric Absorptive Microsampling	69
4.3	Metodevalidering.....	71
4.3.1	Linearitet	72
4.3.2	Nøyaktighet og presisjon.....	73
4.3.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon.....	78
4.3.4	Minste detekterbare konsentrasjon.....	78
4.3.5	Ekstraksjonsutbytte	79
4.3.6	Matrikseffekter	80
4.3.7	Selektivitet.....	81
4.3.8	Overdrag.....	82
4.4	Ekstraksjon av reelle prøver	82
4.5	Fremtidig bruk	83
5	Konklusjon	84
	Litteraturliste	86
	Vedlegg	90

Forkortelser

Ar ₂	Argon
DBS	<i>Dried blood spots</i>
DEHP	Di(2-etylheksyl)fosfat
DEHPi	Di(2-etylheksyl)fosfitt
DMSO	Dimetylsulfoksid
EMA	<i>European medicines agency</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i> /Elektrosprayionisasjon
GHB	<i>γ-Hydroxybutyric acid</i>
HCOOH	Maursyre
HF-LPME	<i>hollow-fiber liquid phase microextraction</i> /hulfiber væskefase-mikroekstraksjon
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> / væskechromatografi
IS	internstandard
LC	<i>liquid chromatography</i> / væskechromatografi
LC- MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> / væskechromatografi koblet med tandem massespektrometri
LC- QqQ	<i>liquid chromatography triple quadrupole</i> / væskechromatografi koblet med trippel kvadrupol
LC- ITMS	<i>liquid chromatography linear ion trap</i> /væskechromatograf koblet med lineær ionefelle
LLE	<i>liquid-liquid-extraction</i> / væske-væske-ekstraksjon
LPME	<i>liquid-phase microextraction</i> / væske-fase mikroekstraksjon

MDK	minste detekterbare konsentrasjon
MKK	minste kvantifiserbare konsentrasjon
MDMA	<i>3,4-Methylenedioxyamphetamine (ecstasy)</i>
ME	matrikseffekter
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	<i>mass spectrometry/ massespektrometri</i>
MS/MS	<i>tandem mass spectrometry/ tandem massespektrometri</i>
m/z	forholdet mellom masse og ladning
OUS	Oslo universitetssykehus
PALME	<i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>
PE	prosesseffektivitet
PVDF	polyvinylidenfluorid
R ²	korrelasjonskoeffisient
RF	<i>Radio frequency/ Radiofrekvens</i>
rpm	<i>revolutions per minute/ omdreininger per minutt</i>
RSD	relativt standardavvik
S/N	<i>signal-to-noise-ratio/ signal-til-støy-forhold</i>
SDME	<i>single-drop liquid-phase microextraction</i>
SLM	<i>Supported Liquid Membrane/ væskemembran</i>
SRM	<i>selected reaction monitoring</i>
Std	standard
THC	<i>Tetrahydrocannabinol</i>
TOA	trioktylamin

UHPLC/UPLC	<i>ultra-high performance liquid chromatography/ ultra-performance liquid chromatography/ væskekromatografi med små partikler og bedre effektivitet enn standard HPLC</i>
UiO	Universitetet i Oslo
VAMS	<i>Volumetric Absorptive Microsampling</i>
WHO	<i>World Health Organization/ Verdens Helseorganisasjon</i>
Å	Ångstrøm
v/v	volume to volume ratio/ blandingsforhold i volum
w/w	weight to weight ratio/ blandingsforhold i vekt

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Ruspåvirket kjøring kan føre til trafikkulykker, skader og dødsfall. De siste tiårene har særlig lav- og middelsinntektsland sett en økning i antallet alvorlige trafikkulykker, og 90 % av dødsulykker i trafikken skjer i slike land [1]. Verdens helseorganisasjon (WHO) estimerer at trafikkulykker kan være den syvende mest vanlige dødsårsaken innen 2030 [2]. For å få innsikt i hvilke stoffer som er vanlige i veitrafikken kan man analysere prøver fra tilfeldig utplukkede bilførere. Å samle urin ved veikanten er utfordrende med tanke på privatliv, og blodprøver krever trent helsepersonell. Spyttprøver har i flere land derfor blitt standard matriks å teste ved veikanten. Samtidig har spyttprøver noen utfordringer knyttet til seg, og tolking av konsentrasjon i spyttprøver er ikke like lett som å tolke blodkonsentrasjoner [3], ettersom man ikke kan vurdere grad av påvirkning fra spyttprøver [4]. *Dried blood spots* (DBS) er en alternativ metode for prøvetaking av blodprøver, hvor man stikker fingertuppen eller hælen, og appliserer en liten mengde blod på et kort med filterpapir laget av for eksempel cellulose. Et lite stikk i fingertuppen er en mindre invasiv måte å samle blod på, og kan enkelt utføres på bilførere i veikanten. Blodprøver på et DBS-kort er lettere å transportere, og de kan bli lagret for flere måneder eller år i romtemperatur så lenge passende luftfuktighet er tilstede. Innen rettsmedisin kan DBS potensielt brukes til å lagre bevismateriale fra avsluttede saker på en kostnadseffektiv måte [3]. Blodet på DBS-papiret er tørket, dette gir redusert risiko for smitte av HIV/AIDS og andre infeksjose patogener, i tillegg til at det øker stabiliteten til mange analytter i blod [3]. Dette bidrar til at DBS kan være særlig aktuelle for forsendelse av prøver fra lav- og middelinntektsland til for eksempel Norge for analyse.

På grunn av utfordringer med dårlig kontroll på mengde blod som appliseres på kortet og spredning av blod på filterpapiret er det utviklet en prøvetakingsmetode som skal overkomme disse utfordringene, *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS). Med denne metoden samler man opp 10 eller 20 µl blod med en liten "prøvesvamp" som absorberer nøyaktig volum. Biologisk prøvemateriale inneholder ofte analytter i lave konsentrasjoner, i en kompleks biologisk matriks som man har begrenset mengde av [5]. Standard analyser av

blodprøver vil ofte kreve 0,1 til 1 ml blod, og DBS/VAMS representerer derfor en spesiell utfordring på grunn av lavt tilgjengelig blodvolum. For å overkomme utfordringene er det nødvendig med gode metoder for opprensing fra biologisk matriks, og sensitive analysemetoder. Sensitive analysemetoder for biologiske prøver er tilgjengelig i form av væskrokromatografi koblet med tandem massespektrometri (LC-MS/MS). LC-MS/MS er særlig utsatt for matrikseffekter, og det er dermed svært viktig med god opprensing fra biologisk matriks [6]. Matrikseffekten kan dempe eller forsterke responsen i analyseinstrumentet, og endre det kvantitative svaret. Dersom signalet fra matrikskomponenter interfererer med analytten kan det også gi falskt positivt svar. I tillegg kan utilstrekkelig rensing av prøvetette kolonnen eller injeksjonsnålen i analyseinstrumentet [6]. Det at man nå har så sensitive instrumenter for analyse som LC-MS/MS, gjør at man trenger mindre prøvemateriale selv om materialet inneholder svært lave konsentrasjoner analytt. Dette åpner for at DBS-kort og VAMS kan brukes innen rettsmedisinen. Ved rusmiddeltesting på arbeidsplassen eller av bilførere i veikanten, ved seksuelle overgrepssaker hvor narkotika er involvert, og ved oppfølging av rusmiddel- og alkohol-avhengige, har DBS/VAMS stort potensiale ved at det er en enkel og rask prøvetakingsmetode [3].

Prøveopparbeidelsen utgjør i gjennomsnitt 61 % av total analysetid [7], og blir sett på som det hastighetsbestemmende trinnet i en analyseprosess. Det er ønskelig med en effektiv metode for analyse av biologiske prøver. Med ekstraksjonsmetoden *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) kan VAMS-«svampene» med biologisk prøve puttes direkte i en 96-brønnsplate og ekstraheres uten forutgående eluering. PALME er utviklet fra HF-LPME, og teknikkene er basert på prinsippene for væske-væske ekstraksjon (LLE). Ekstraksjonsteknikken er utviklet på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo (UiO) [8]. PALME utføres i et 96-brønns format, og er et trefasesystem hvor analyttene ekstraheres fra vandige prøver i en donorbrønn, over en organisk væskemembran, og til en vandig akseptorløsning. Separasjonen av analytt og komponenter i prøveløsningen baseres på en pH-gradient, som dannes ved å justere pH i prøveløsningen og akseptorløsningen. Etter ekstraksjonen sitter man igjen med analytt som er løst i en vandig akseptorløsning, hvor analytten har blitt isolert fra biologisk matriks. Den vandige akseptorløsningen kan injiseres direkte i analyseinstrumentet.

PALME som prøveopparbeidelsesmetode kombinert med VAMS som prøvetakingsmetode gir få arbeidstrinn for operatør, og kan delvis automatiseres. Det er en effektiv og tidssparende metode ved at man kan ekstrahere 96 prøver samtidig, og man har gode muligheter for oppkonsentrering, noe som kan være fordelaktig med så lavt volum av prøvematriks [9]. PALME-platene er rimeligere i pris enn andre kommersielt tilgjengelige prøveopparbeidelsesmetoder i 96-brønnsformat slik som *Solid-Phase Extraction* (SPE) eller fosfolipidfjerningsplater. Ekstraksjonen kan også utføres med svært lave volum organiske løsemidler, noe som gjør PALME til en miljøvennlig prøveopparbeidelsesmetode.

1.2 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle, optimalisere og validere en analysemetode for rusmidler i blod der VAMS ble brukt for prøvetaking, og prøveopparbeidelsen ble gjort ved PALME. Metoden inkluderte de vanligste stoffene som påvises hos bilførere som er tatt for å være påvirket av rusmidler. Ved å bruke VAMS som prøvetakingsmetode unngår man ulemper knyttet til de tradisjonelle blodprøvene. PALME er en effektiv ekstraksjonsmetode hvor «svampene» kan puttes direkte i en 96-brønnsplate, uten forutgående eluering og ekstraktet kan injiseres direkte i LC-MS/MS. Målet var å inkludere de 20 mest påviste rusmidlene i veitrafikken i en robust og effektiv analysemetode, som skal være enkel å utføre, bruke lite løsemidler og være rimelig i pris.

2 Teori

2.1 Rusmidler

Rusmidler er stoffer som gir en opplevelse av rus, slik som stimulering eller demping av sentralnervesystemet, hallusinasjoner og andre psykosesymptomer [10]. Rusmidler kan være alkohol, organiske løsemidler, cannabisstoffer, nerveberoligende medikamenter, sovemidler, GHB, opiat og opioider, sentralstimulerende stoffer og hallusinogener [10].

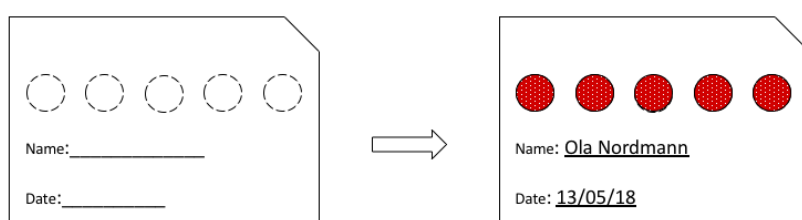
Bruk av rusmidler er en av de viktigste årsakene til trafikkulykker [1]. WHO oppgir at trafikkulykker verden over dreper mer enn 1,2 millioner mennesker hvert år [2]. I Norge dør cirka 200–250 personer i trafikken hvert år [1], hvor ruspåvirket kjøring er en vesentlig risikofaktor. Antall sjåførere som er pågrepet for mistanke om alkoholbruk og ruspåvirket kjøring, er henholdsvis omtrent 6000 og 4000 tilfeller per år [1]. Ved divisjon for rettsmedisin på Oslo universitetssykehus analyseres og tolkes blodprøver fra bilførere som mistenkes å være påvirket av rusmidler. De vanligste rusmidlene som påvises er etanol, amfetamin/metamfetamin, THC (cannabis), benzodiazepiner og opiat [1]. I 2017 ble det påvist en økende forekomst av «partydop» i form av MDMA (ecstasy) og kokain. Det ble påvist 15 ulike benzodiazepiner blant bilførere, hvor mange av dem er illegale stoffer som omtales som «designerbenzodiazepiner» [11].

Retts toksikologi og rusmiddelkontroll er sammen med terapeutisk legemiddelmonitorering og dopingkontroll arenaer hvor analyse av biologiske prøver er nødvendig. Biologisk matriks som analyseres kan være hår, spytt, urin, blod og plasma. Analyse av biologiske prøver er utfordrende og krever sensitive og nøyaktige analysemetoder. Dersom gitte krav ikke oppfylles kan dette føre til falske positive eller falske negative resultat, som kan ha store konsekvenser når analysen benyttes i sammenheng med brudd på straffeloven, veitrafikkloven, fengselsloven, eller i forbindelse med ulovlig bruk av legemidler, rusmidler og dopingmidler [12].

2.2 Mikrosampling av blodprøver

2.2.1 Dried blood spots (DBS)

DBS er en alternativ metode for prøvetaking av blodprøver. Man stikker i fingertuppen eller hælen med en lansett, og appliserer en liten mengde blod på DBS-kortet (**figur 2.1**).



Figur 2.1: Dried blood spot (DBS) kort.

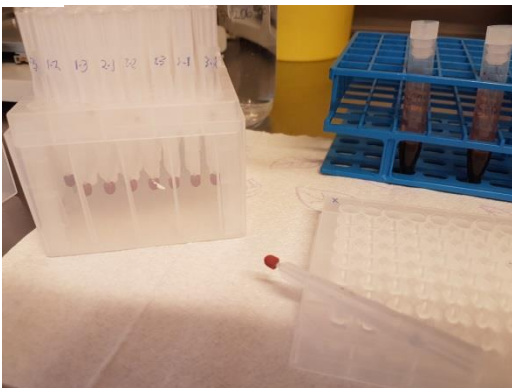
Ideen om å bruke blod samlet på et cellulosepapir ble først utviklet av nordmannen Ivar Christian Bang, som i 1913 tok DBS i bruk for å undersøke glukosenivå i blod [13]. I 1963 ble DBS introdusert av Dr. Robert Guthrie som prøvetakingsmetode for å bekrefte fenyلكetonuri hos nyfødte [14]. Etter dette har DBS gjennom årene vært et viktig verktøy for å diagnostisere genetiske sykdommer for nyfødte i mange land over hele verden [13]. Tidligere var det begrensninger for bruken av DBS innen rettsmedisin, fordi det ikke fantes analyseinstrumenter med tilstrekkelig sensitivitet. Med så følsomme instrumenter som LC-MS/MS kan DBS bli brukt på mange områder, som for eksempel; diagnostisk screening, terapeutisk legemiddelovervåking, toksikokinetikk og farmakokinetikk. Som nevnt i innledningen har DBS flere fordeler, ved at det er en enkel måte å samle blod på, som gir redusert risiko for smitte, og blodprøvene er lettere å transportere og lagre [3]. Metoden har noen utfordringer ved at prøvevolumene er små, og dette stiller krav til sensitive analyseinstrumenter. Individuelle forskjeller i hematokrit mellom mennesker fører til forskjellig spredning av blod på filterpapiret, noe som kan påvirke analyttkonsentrasjonen [14]. Hematokrit er den prosentvise andelen av blodvolumet som de røde blodcellene utgjør [15]. Lav andel røde blodceller, og dermed lav hematokrit, fører til redusert blodvolum i prøven når en konstant størrelse klippes ut av DBS-kortet [16].

Flere ulemper ved DBS kan være mangel på kontroll av mengde blod som appliseres på kortet, eller homogenitet av analytt i blodet [14]. En mulig utfordring kan oppstå ved kalde forhold da man kan ha nedsatt sirkulasjon til fingrene, og det kan være vanskelig å få ut nok blod fra et stikk i fingertuppen. Det er viktig ikke å klemme ut blodet fra fingertuppen, da dette kan føre til at det kommer ut vevsvæske, og målingene kan gi feil resultat.

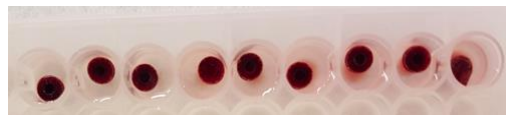
2.2.2 Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS)

VAMS er en alternativ prøvetakingsmetode til DBS. Med VAMS samler man opp for eksempel 20 µl blod med en liten ”prøvesvamp” som absorberer nøyaktig volum ved hjelp av kapillærkrefter [17]. VAMS har de samme fordelene som DBS, men løser utfordringene DBS har med prøvevolum og homogenitet [18]. Det har blitt demonstrert at denne prøvetakingsmetoden i mindre grad influeres av variasjoner i hematokrit [18]. I motsetning til DBS-kortene, hvor man må stemple ut blodråpen fra kortet før ekstraksjon, kan hele «prøvesvampen» ekstraheres uten videre arbeidstrinn. VAMS-utstyret er tillaget for enkelt å kunne automatiseres med utstyr som er tilgjengelig i mange bioanalytiske laboratorier [17].

A)



B)



Figur 2.2: A) *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS). B) En rad med VAMS-tipper (”svamper”) i 96-brønnsplaten som brukes i PALME.

2.3 Prøveopparbeidelse

Fullblod er en inhomogen suspensjon av røde blodceller, hvite blodceller, trombocytter og en matriks kalt plasma. Plasma består av 90 % vann, samt uorganiske molekyler (primært Na^+ og Cl^-), og organiske komponenter som primært er proteiner (albumin, globulin og fibrinogen)

[19]. Komponenter i fullblod, som fosfolipider, proteiner og blodceller vil kunne forstyrre eventuell respons fra analyttene som skal detekteres i analyseinstrumentet. I tillegg kan direkte injeksjon av fullblod føre til at komponenter i blodet tetter injeksjonsnålen eller kolonnen i analyseinstrumentet. Det er derfor viktig å gjøre en prøveopparbeidelse først, som tar sikte på å separere analyttene som skal detekteres fra resten av prøven. I tillegg kan legemidler og rusmidler foreligge i svært lave konsentrasjoner, i begrenset mengde blodprøve. Da bør prøveopparbeidelsen ta sikte på å oppkonsentrere legemidlet/rusmidlet [20].

2.3.1 Væske-væske-ekstraksjon

Væske-væske-ekstraksjon (*liquid-liquid-extraction*, LLE) er et tofasesystem mellom vann og et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann. Vann har en polaritetsindeks (PI) på 10,2. For at et løsemiddel ikke skal blandes med vann, må det ha en PI under 4–5 [6].

Det er viktig å velge løsemiddel på bakgrunn av analyttenes egenskaper. Molekylære interaksjoner mellom analytt og løsemiddel kan være svake hydrofobe interaksjoner, eller i økende styrke, dispersjon-interaksjoner, dipol-interaksjoner og hydrogenbindings-interaksjoner [6]. For upolare analytter kan man benytte upolare løsemidler, hvor hydrofobe interaksjoner fungerer som molekylær interaksjon mellom løsemiddel og analytt. Ekstraksjon av basiske analytter kan utføres med et løsemiddel som er en hydrogenbindingsdonor, hvor hydrogenbindings-interaksjoner fungerer som molekylær interaksjon. Det er mulig å blande flere løsemidler for å modifisere polaritet og forbedre analyttens utbytte. Andre ting som er viktig å tenke på når en velger løsemiddel er viskositet, tetthet, flyktighet, toksisitet, ekstreme pH-verdier og løselighet i vann.

Ekstraksjonen er fremmet av at analytten har ulik løselighet i de to fasene. Dette gjør at analyttene kan isoleres fra en vandig prøveløsning og løse seg i et organisk løsemiddel, som ikke er blandbar med prøveløsningen. Vandige forurensinger forblir i prøveløsningen. Ekstraksjon av analytt er illustrert i **Ligning 1**.

Ligning 1 [6]: $A_{\text{[vandig prøveløsning]}} \rightleftharpoons A_{\text{[Organisk løsemiddel]}}$

For å beskrive fordeling av analytten mellom organisk og vandig fase kan man benytte fordelingskoeffisienten, K_d . Dette er beskrevet med **Ligning 2**.

Ligning 2 [21]: $K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$

De fleste legemidler har sure eller basiske egenskaper. Analyttens pKa-verdi og pH i vannfasen man løser analytten i, bestemmer om analytten er i dissosiert eller udissosiert form i vandige løsninger. Fordelingen av analytten mellom det organiske løsemiddelet og den vandige prøveløsningen, uttrykkes ved fordelingsforholdet D. For en basisk analytt er fordelingen beskrevet med **Ligning 3**.

Ligning 3 [22]: $D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} = \frac{[HA]_{org}}{[A]_{aq} + [AH^+]_{aq}}$

Ved å justere pH i den vandige løsningen til to enheter under eller to enheter over den basiske analyttens pKa-verdi, oppnås fullstendig protonert eller nøytral form av analytten. Noen utfordringer med LLE som ekstraksjonsmetode er et høyt forbruk av løsemidler og at metoden er vanskelig å automatisere [22].

2.3.2 Væske-fase mikroekstraksjon

Væske-fase mikroekstraksjon (LPME) er basert på prinsippene for LLE. Fordeler med ekstraksjonsmetoden er at den gir rene ekstrakter, gode muligheter for oppkonsentrering av analytt og lavt forbruk av organiske løsemidler [23].

LPME kan deles inn i tre hovedtyper, som består av *Single drop microextraction* (SDME), *Hollow-fiber microextraction* (HF-LPME) og *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME) [23].

HF-LPME ble introdusert av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen i 1999 [24]. Teknikken består av en donorløsning med prøve, og en akseptorløsning som analyttene skal overføres til. De to fasene separeres av en organisk væskemembran. Den organiske væskemembranen er en hulfiber med porøs polypropylen som dyppes i et organisk løsemiddel, slik at løsemiddelet immobiliseres i porene til hulfiberen ved hjelp av kapillærkrefter [25]. Den organiske væskemembranen kalles *supported liquid membrane* (SLM). I hulrommet av denne tilsettes en passende akseptorløsning, som er et vandig eller et organisk løsemiddel, avhengig av hvilken betingelse man vil ha analyttene løst i. Hulfiberen med passende akseptorløsning plasseres i en donorbrønn med vandig prøve.

Avhengig av om akseptorløsningen er organisk eller vandig, dannes det enten et tofase- eller et trefasesystem. Tofase- og trefasesystem illustreres henholdsvis av **ligning 1 og 4**.

Ligning 4 [26]: $A_{[\text{vandig prøveløsning}]} \rightleftharpoons A_{[\text{organisk væskemembran}]} \rightleftharpoons A_{[\text{vandig akseptorløsning}]}$

Hvilket ekstraksjonssystem som velges avhenger av analyttens egenskaper, som polaritet og syre- eller base-grupper, og hvilket analyseinstrument som skal benyttes. Tofase HF-LPME passer godt for analytter som har lav eller medium polaritet, og som skal analyseres med GC [25].

Trefasesystem brukes for sure eller basiske analytter som kan ioniseres. For at analyttene skal ekstraheres over til den organiske væskemembranen må de være i nøytral form. Avhengig av analyttens kjemiske struktur justeres pH i prøveløsningen slik at den er to pH-enheter under eller over analyttens pKa-verdier. For basiske analytter utføres ekstraksjonen ved å ha basiske betingelser i donorfasen. Analytten vil da løse seg i den organiske væskemembranen i nøytral form. Akseptorløsningen kan justeres til en sur pH, slik at analyttene ioniseres. Når analyttene er ionisert vil de ha en høyere affinitet for vandige løsninger, og de løses dermed i akseptorløsningen. For analytter med sur karakter, må pH-gradienten reverseres.

Ulike parametere påvirker ekstraksjonen, som hvilken type hulfibermateriale, type organisk løsemiddel, ekstraksjonstid, pH i donorfasen og akseptorløsningen, temperatur og saltinnhold [23].

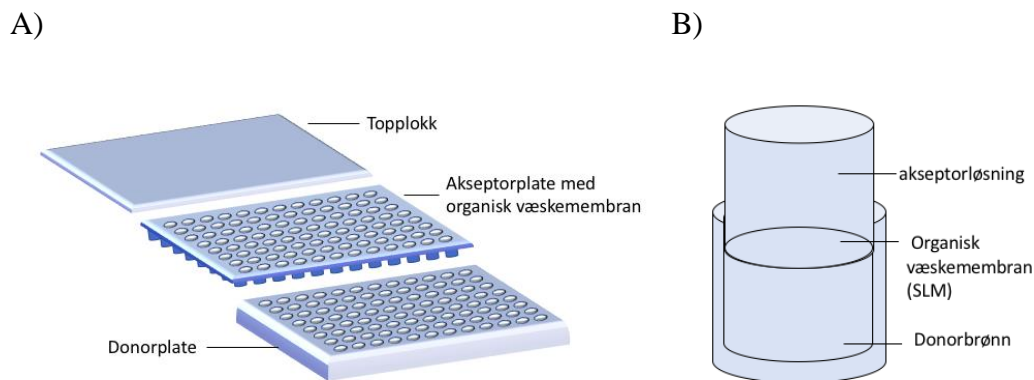
En av utfordringene for HF-LPME er at teknikken er utviklet med hjemmelaget utstyr, og man mangler kommersielt tilgjengelig utstyr for at teknikken skal kunne benyttes i rutinelaboratorier [8].

2.3.3 Parallel artificial liquid membrane extraction

For å lage et mer brukervennlig ekstraksjonssystem ble *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME) introdusert i 2013 [8]. PALME er utviklet fra HF-LPME, og prinsippet ligner i stor grad trefasesystemet i HF-LPME. I PALME kan det gjøres 96 ekstraksjoner samtidig på en plate.

PALME-oppsettet består av en donorbrønnplate og en akseptorplate med filtre laget av polyvinyliden difluorid (PVDF) eller polypropylen (PP) på bunnen. Akseptorplaten med PP-

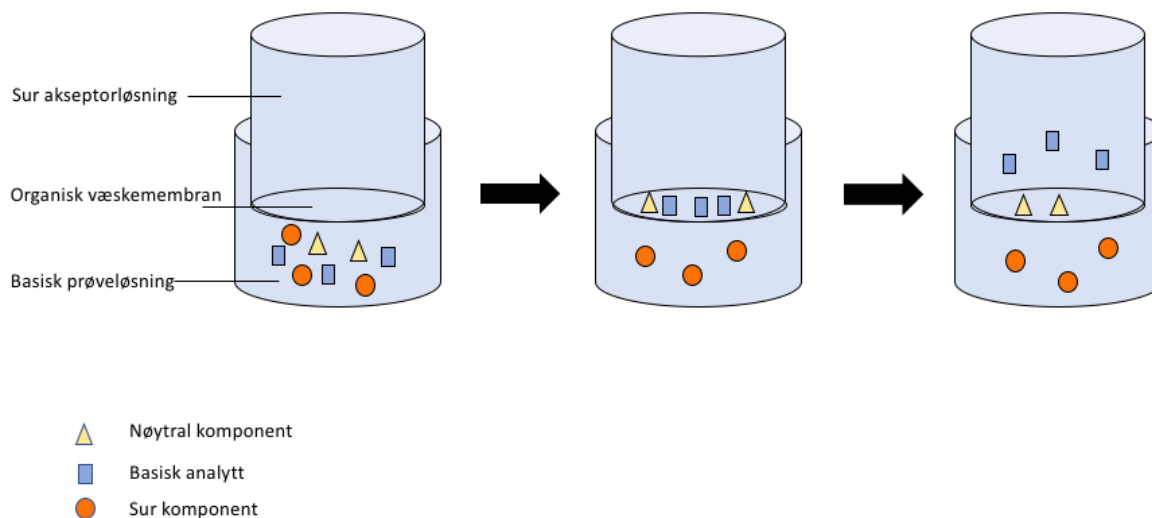
filtre er å foretrekke fordi PP gir opphav til mindre uspesifikk binding av stoffer enn PVDF, men akseptorplater med PP filtre er foreløpig ikke kommersielt tilgjengelige [27]. For å hindre fordamping av akseptorløsningen legges et lokk eller en forseglingsfilm over ekstraksjonsoppsettet. Oppsettet er fremstilt i **Figur 2.3**.



Figur 2.3: Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction (PALME) oppsett (A) Donorplate, akseptorplate med organisk væskemembran, og et lokk for å hindre fordamping. (B) Oversikt over ekstraksjonsoppsettet i hver enkelt brønn.

Til hver donorbrønn tilsettes 250 μl prøveløsning. På undersiden av akseptorplaten tilsettes 3–5 μl organisk løsemiddel på PVDF-filretet, løsemidlet immobiliseres i membranporene og danner en organisk væskemembran. Til slutt tilsettes 50–150 μl akseptorløsning i akseptorbrønnene.

På samme måte som for trefase HF-LPME egner teknikken seg best for analytter med sure eller basiske egenskaper. pH-gradienten i ekstraksjonssystemet er en viktig parameter for optimal ekstraksjon. Hvilken pH-gradient som gir optimal ekstraksjon avhenger av analyttens kjemiske egenskaper. Analyttene diffunderer i nøytral form fra prøven i donorbrønnen, til den organiske væskemembranen. For at analytten skal ekstraheres fra den organiske væskemembranen til akseptorløsningen i akseptorplaten, er det nødvendig at pH i akseptorløsningen er justert slik at analytten ioniseres, og ekstraheres over til den vandige løsningen.



Figur 2.4: Ekstraksjonsprosessen i PALME.

Oppsettet ristes i 30–60 minutter for å fremme ekstraksjonen. Ettersom den vandige akseptorløsningen er kompatibel med LC-MS/MS, kan ekstrakter injiseres direkte i analyseinstrumentet.

2.4 Væskrokromatografi

En reell prøve inneholder ofte flere analytter. Før de enkelte analyttene kan detekteres, bør de separeres fra hverandre. Kromatografi baserer seg på at en væske eller gass transporterer et stoff over en fast fase som ligger i ro. Væsken eller gassen kalles mobilfase, og den faste fasen kalles stasjonærfase. Stasjonærfasen består av faste partikler som er pakket i et rør, som man kaller kolonne. Når mobilfasen er en væske, kalles det væskrokromatografi. Når analyttene kommer ut på andre siden av kolonnen skal analyttene i prøven ideelt være separert før de går videre til detektoren (2.5 Massespektrometri).

Hvor mye analyttene retarderes på kolonnen er avhengig av flere faktorer. Analyttens kjemiske egenskaper er en konstant betingelse, mens analyttens ladning, stasjonærfasens kjemi og innholdet i mobilfasen kan endres for å oppnå ønsket separasjon. Kolonnens diameter, lengde og partikkelstørrelse er også viktige parametere som kan optimaliseres.

Dersom mobilfasesammensetningen holdes konstant under hele analysen, kalles dette isokratisk eluering.

Ved å endre på mobilfasesammensetningen underveis i separasjonen kan man effektivt separere analytter som eluerer nært hverandre, og man kan gjøre effektive og raske separasjoner. Dette kalles gradienteluering. Separasjonen utføres med *High performance liquid chromatography* (HPLC) eller *Ultra-high performance liquid chromatography* (UHPLC). En tradisjonell HPLC-kolonne er 10–25 cm lang, med en indre diameter på 4,6 mm. Vanlig partikkelstørrelse er mellom 3–5 μm . En UHPLC kolonne er typisk 3–10 cm lang, med en indre diameter på 1–2,1 mm og partikkelstørrelse mellom 1,5 og 2 μm . I denne oppgaven er en UHPLC benyttet for separasjon. Ved å benytte en UHPLC kan man oppnå reduserte analysetider og lavere forbruk av mobilfase. Instrumentet muliggjør lavere deteksjonsgrense og mindre prøvevolum. Separasjonen kan baseres på ulike prinsipper, i denne oppgaven har omvendt-fase kromatografi blitt benyttet.

2.4.1 Omvendt-fase kromatografi

I omvendt-fase kromatografi er stasjonærfasen hydrofob og mobilfasen en vandig løsning, noe som muliggjør direkte analyse av vandige prøver. Stoffene retarderes basert på hydrofob interaksjon [28]. Interaksjonen oppstår mellom den upolare delen av molekylet og hydrokarbonkjeden i stasjonærfasen, disse kreftene kalles van der Waals-krefter. De mest hydrofobe stoffene har sterkest interaksjon med stasjonærfasen, og retarderes på kolonnen lengst. Det finnes flere ulike typer stasjonærfaser. I omvendt-fase kromatografi består stasjonærfasene i hovedsak av silikamateriale som er kjemisk modifisert med mer eller mindre hydrofobe organiske molekyler. Det mest brukte materialet er octadecylsilika (C18). Det ble brukt to ulike kolonner i denne oppgaven, en var en HSS T3 C18-kolonne, mens den andre var en Bifenyl-kolonne med *core-shell* partikler. T3-kolonnen er sett å gi god retensjon for polare forbindelser og er kompatibel med ren vandig mobilfase [29]. Bifenyl-kolonnen egner seg til å separere aromater, polysykliske og umettede forbindelser, hvor pi-pi interaksjoner mellom elektronrike dobbeltbindinger hos analyttene og fenyldgruppene i stasjonærfasen fungerer som en ekstra interaksjon [30]. Studier har vist høyere hydrogenbinding-kapasitet i forhold til C18 kolonner [31]. Sammen med egenskapene til stasjonærfasen, er sammensetning av mobilfasen bestemmende for hvordan separasjonen av stoffene i en prøve blir. Mobilfasen som benyttes i omvendt-fase kromatografi er vandig, og er en sammensetning av vann og ett eller flere organiske løsemiddel som er blandbart med

vann [28]. Innholdet av organisk løsemiddel avgjør styrken på mobilfasen. I en omvendt-fase kolonne øker retensjon av analysene ved økende mengde vann.

For analytter som er nøytrale vil mengde organisk løsemiddel som tilsettes mobilfasen alene avgjøre hvor mye de retarderes på kolonnen. Analytter som er syrer eller baser kan ioniseres. Når en analytt blir ionisert vil den bli mer hydrofil, og løses i den vandige mobilfasen, noe som fører til at retensjonen på den hydrofobe stasjonærfasen på kolonnen blir kortere. pH i mobilfasen har altså stor betydning når analytter som er syrer eller baser skal analyseres, og denne kan justeres ved å tilsette buffer. Det er viktig å være oppmerksom på pKa-verdien til analytt når man skal bestemme pH i mobilfasen. Dersom pH i mobilfasen er omkring analyttens pKa-verdi, vil små endringer i pH ha stor betydning på hvor mye som er på ladet eller uladet form, noe som kan skape store forandringer i separasjonen. Ved å velge en pH som er ± 2 pH-enheter fra analyttens pKa-verdi vil analytten være fullstendig ionisert eller fullstendig uionisert, noe som gir en robust separasjonsmetode. Dersom silikabaserte stasjonærfaser benyttes må pH ligge i området 2–8, fordi høyere pH kan løse opp silika, og lavere pH kan føre til at de funksjonelle gruppene spaltes av [28]. Det er også viktig å ha kontroll på temperatur, fordi temperaturendringer vil influere retensjon, effektivitet, selektivitet og kolonnenes mottrykk. I tillegg er temperaturen viktig med tanke på stabiliteten til stasjonærfasen i kolonnen og stabiliteten til analytten.

2.4.2 *Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC)*

I denne oppgaven er UHPLC brukt for kromatografisk separasjon av analytter. UHPLC gir raskere separasjon enn HPLC. I HPLC er det vanlig å bruke kolonner pakket med 3 og 5 μm partikler [32]. Ved å redusere partikkelstørrelsen i kolonnen kan man oppnå en mer effektiv separasjon. Dersom partikkelstørrelsen reduseres møter man utfordringen med at systemets mottrykk blir for høyt. Ved å bruke en kolonne pakket med partikler så små som 1,5–2 μm kan man oppnå et veldig høyt antall teoretiske plater (N), og derfor kan kolonnenlengden og analysetiden reduseres [32]. I tillegg bruker man betydelig mindre mobilfase.

Platetallet (N) påvirkes av kolonnens lengde (L) og diameteren til pakkematerialet (d_p) som vist i **ligning 5**.

Ligning 5 [33]: $N \propto \frac{L}{d_p}$

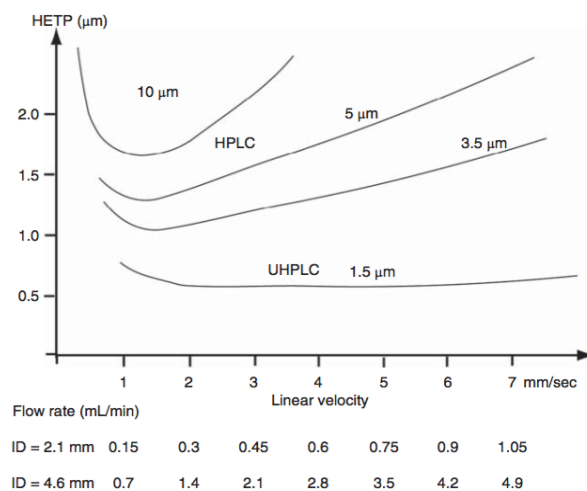
Ved å pakke kolonnen med partikler som er under 2 μm , kan mottrykket komme opp til 1000 bar. Det kreves da utstyr som klarer et så høyt trykk. Pumpene i UHPLC kan kjøre med et trykk på opp til 1000-1500 bar.

Båndspredningen måles av parameteren antall teoretiske plater. Ved et høyt antall teoretiske plater er båndspredningen liten [33]. Båndspredningen er avhengig av faktorene eddydiffusjon, longitudinal diffusjon og masseoverføring [34]. Van Deemters ligning (**ligning 6**) beskriver forholdet mellom lineær mobilfasehastighet og platehøyde (H eller HETP) i tillegg til de ulike faktorene som påvirker platehøyden.

Ligning 6 [34]: $H = A + \frac{B}{u} + C_u$

Hvor H er høydeekvivalenten til en teoretisk plate, og er uavhengig av lengden til kolonnen, u er hastigheten til mobilfase, A er diffusjon i mobilfase, B er eddydiffusjon og C er massetransport mellom stasjonær- og mobilfase.

Plot av H mot u kalles van Deemter plot. Van Deemter plot beskriver sammenhengen mellom H og u, og hvordan den påvirkes av partikkelstørrelsen.



Figur 2.5 [32]: Van Deemter plot: Sammenhengen mellom høydeekvivalenten til en teoretisk plate H som funksjon av hastigheten til mobilfase u for partikler som er 1.5 μm , 3.5 μm , 5 μm og 10 μm .

Eddydiffusjon gir et bidrag til båndbredde ved at mobilfasen tar forskjellig vei gjennom partiklene som er pakket i stasjonærfasen. I pakke kolonner er størrelsen på eddydiffusjon proporsjonal med partikkelstørrelsen, hvor store og inhomogene partikler gir større bidrag til båndbredden [34]. Man kan motvirke eddydiffusjon ved å pakke kolonnene med små, runde og homogene partikler [33]. Et molekyl i en mobilfase har en naturlig tendens til å diffundere fra et konsentrert bånd til mindre konsentrerte områder. Når dette skjer i mobilfasen, kaller vi det longitudinal diffusjon [34]. Massetransport forekommer i mobilfasen og beskriver båndbredden som kommer av transport av analyttene fra en fase til en annen, ved at mobilfasen beveger seg saktere nært partiklene sammenlignet med midt mellom partiklene. Inne i porene til de porøse partiklene beveges mobilfasen mindre. Mindre partikler gir mindre bidrag til H, og dermed kolonner med høyere effektivitet. Det forekommer massetransport også i stasjonærfasen ved adsorpsjon [34]. En mulighet til å øke effektiviteten ytterligere er bruk av *Core-shell* partikler, da disse reduserer bidraget fra alle faktorene som bidrar til båndspredningen [35].

2.5 Massespektrometri

Massespektrometer koblet til HPLC brukes mye i bioanalyse. Massespektrometer kan brukes til å identifisere nye metabolitter i biologisk matriks, samt er velegnet til å identifisere nye molekyler og kvantifisere disse i svært små konsentrasjoner. Molekyler som skal analyseres med et massespektrometer må kunne ioniseres og transporteres til gassfase. Mobilfasen som brukes må være flyktig.

Ionisering av molekylene og overføring til gassfase skjer i prøveinnføringssystemet, som ligger mellom væskrokromatografen og massespektrometeret. Etter at molekylene er ioniserte og overført til gassfase, separerer masseanalysatoren ionene basert på masse-ladnings forhold. Det finnes flere ulike ioniserings metoder og masseanalysatorer. I denne oppgaven brukes elektroprayionisasjon (ESI) som ionisering-metode. De innledende forsøkene og de fleste optimaliseringsforsøkene er gjort med en ionefelle som masseanalysator. Siste del av optimaliseringsforsøkene og metodevalideringen ble utført med trippel kvadrupol som masseanalysator.

2.5.1 Elektrosprayionisasjon (ESI)

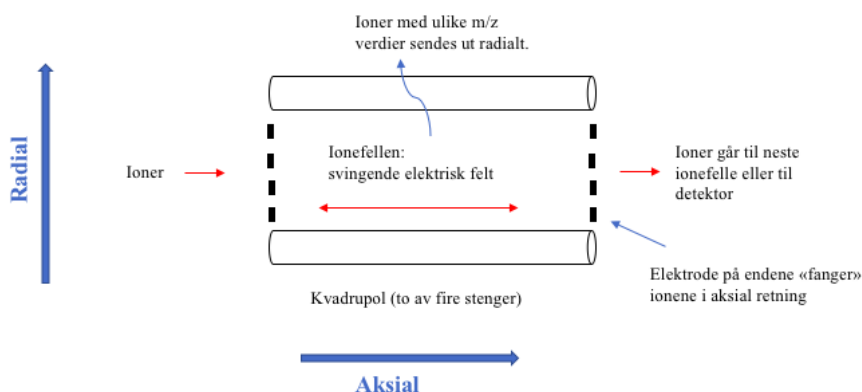
ESI er en av ioniseringsteknikkene som benyttes innen massespektrometri. ESI utføres i atmosfærisk trykk, og brukes for molekyler med polare grupper (nøytrale molekyler, syrer og baser). Mobilfasen som inneholder analyttene sendes gjennom et trangt kapillær, og ved utløpet av kapillæret forstøves væsken med nitrogengass slik at det dannes en aerosol med dråper som er ladet på overflaten [36]. Det ligger en høy spenning, 2–5 kV, mellom kapillæret og en elektrode som er lagt etter utgangen til kapillæret. De ladete dråpene vil minske i størrelse på vei mot inngangen av massespektrometeret ved at den flyktige væsken i dråpene fordamper. Ladningen på dråpenes overflate øker til et kritisk punkt, hvor de deler seg i mindre dråper. Dette skyldes at elektrostatisk frastøtning blir større enn overflatespenningen [36]. Prosessen gjentas, og til slutt er ionene i gassfase. Etter hvert som væsken fordamper, spyles den ut ved hjelp av en gasstrøm som kalles *tørke-gass* [37]. De ladede molekylene vil ved hjelp av den elektriske spenningen trekkes inn i masseanalysatoren [37]. *Cone-gas* kommer motstrøms ut fra «*cone*» som de ladede molekylene beveger seg mot, og kan fjerne løsemiddelklustre og motvirke adduktformasjon.

Deteksjonen kan utføres i positiv modus, hvor de protonerte ionene blir detektert, eller i negativ modus hvor de deprotonerte ionene blir detektert. De detekterte ionene kalles protonerte/ deprotonerte molekylion, og gir m/z som er $(M+H)^+$ eller $(M-H)^-$. Ved ESI vil vanligvis lite fragmenteres i ionekilden, slik at hele det protonerte/deprotonerte molekylionet forblir intakt [37]. Teknikken omtales derfor som en “myk” ioniseringsteknikk. Metoden gir dermed vanligvis informasjon om molekylmassen til analytten, men lite strukturell informasjon. Ved å koble ESI med tandem massespektrometri (ESI-MS/MS), kan man innhente mer detaljert informasjon om strukturen til analytten [38].

2.5.2 Masseanalysatorer

En masseanalysator separerer ioner basert på m/z -verdier. Ionene blir deretter sendt til en detektor. I denne oppgaven ble separasjon utført med tandem massespektrometri (MS/MS). Ved å koble to masseanalysatorer kan man oppnå mer informasjon enn man kan ved å bruke én analysator alene. I denne oppgaven ble henholdsvis en lineær ionefelle og en trippel kvadrupol brukt som masseanalysatorer

Lineær ionefelle som masseanalysator

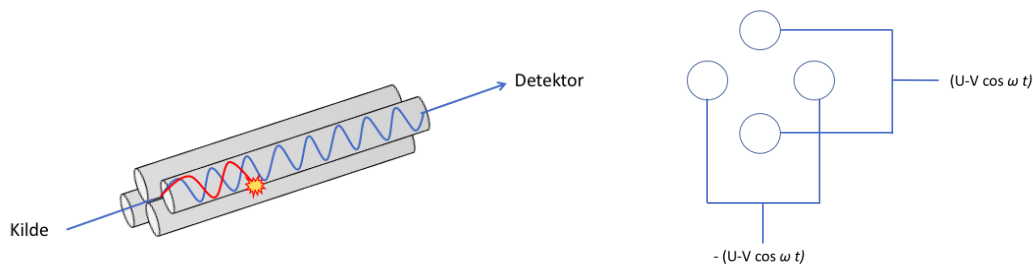


Figur 2.6: Den midterste elektroden i en lineær ionefelle. Modifisert fra [38].

Den lineære ionefellen består av fire parallelle staver som ligner på kvadrupoler. Tre kvadrupol-lignende elektroder ligger etter hverandre. Stavene som ligger parallelt med hverandre har samme spenning. Ionene blir stabilisert og fanget i den midterste elektroden, ved at et radiofrekvent potensial (RF) tilføres de fire parallelle stavene, og aksialt ved å legge på likestrøm på elektrodene på endene [39, 40]. Ved å forandre RF-potensialet og likestrømmen kan ioner med spesifikke m/z -verdier sendes ut av ionefellen i aksial retning til detektoren hvor ionene med den bestemte m/z -verdien detekteres, eller til en annen ionefelle som er koplet til den første (MS/MS). Man kan også isolere spesifikke ioner ved å sende ut alle andre ioner med ulike m/z verdier i radial retning [38]. I denne oppgaven har det blitt brukt en lineær ionefelle som skanner ionene over tid. Det vil si at alle operasjonene foregår i samme ionefelle, men til forskjellig tid.

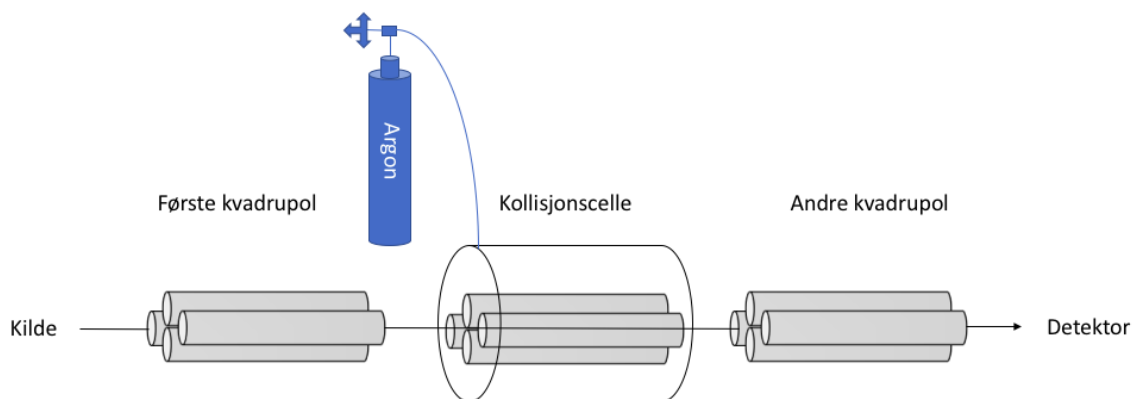
Kvadrupol som masseanalysator

En kvadrupol består av fire identiske staver som er plassert parallelt til hverandre. De stavene som ligger parallelt til hverandre har lik ladning. Det genereres et svingende elektrisk felt av likestrøm og radiofrekvens. Hver m/z -verdi vil ha visse kombinasjoner for likestrøm og radiofrekvens som gjør at de svinger stabilt. De ionene som er stabilt svingende vil nå detektoren, mens de som ikke er stabile vil kolliderer i stavene i kvadrupolen. Kvadrupolen kan operere etter to ulike prinsipper; spekteroptak, som tar opp massespektre per tidsenhet, hvor massene blir målt etter hverandre, eller selektiv ionemonitorering (SIM) som kontinuerlig måler på en masse [32].



Figur 2.7: Kvadrupolanalysator. Modifisert fra [32]

En trippel kvadrupol består av to kvadrupoler og en kollisjonscelle plassert i midten. En trippel kvadrupol kan brukes til ulike operasjoner. *Selected reaction monitoring* (SRM) eller *multiple reaction monitoring* (MRM) brukes for kvantifisering, og er den scannformen som ble brukt i oppgaven. Her blir ionene som skal fragmenteres separert i den første kvadrupolen. Deretter går ionene inn i kollisjonscellen som inneholder en inert gass, normalt argon (Ar_2). I kollisjonscellen blir molekylene fragmentert ved at de kolliderer med gassmolekylene. I den siste kvadrupolen blir de spesifikke fragmentene separert og sendt videre til detektoren.



Figur 2.8: Skjematisk tegning av kvadrupolanalysator. Modifisert fra [32]

3 Materiale og metode

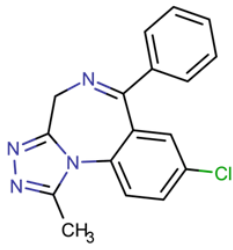
Materiale og metode beskriver analytter, kjemikalier og utstyr som ble brukt i oppgaven, og deretter hvordan forsøkene ble utført.

3.1 Karakteristikk av analytter

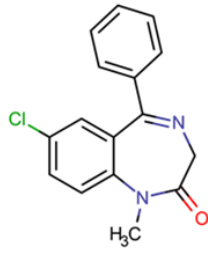
Analyttenes fysikalsk-kjemiske egenskaper og hvilken stoffklasse de hører til er oppsummert i **tabell 3.1** og analyttenes strukturformler er vist i **figur 3.1**.

Tabell 3.1: Analyttkarakteristikk [41]

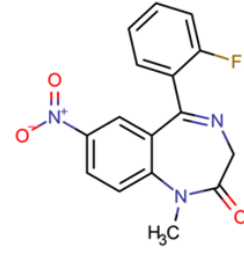
Komponent	Molekylformel	Molekylvekt (g/mol)	Basisk pKa	Log P	Stoffklasse
Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$	308,8	5,0	3,0	Benzodiazepin
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	284,7	2,9	3,1	Benzodiazepin
Flunitrazepam	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	313,3	1,7	2,6	Benzodiazepin
Klonazepam	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$	315,7	1,6	2,5	Benzodiazepin
Nitrazepam	$C_{15}H_{11}N_3O_3$	281,3	2,7	2,6	Benzodiazepin
Oksazepam	$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$	286,7	-1,5	2,9	Benzodiazepin
Zopiklon	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	388,8	6,9	2,7	Benzodiazepinlignende
Zolpidem	$C_{19}H_{21}N_3O$	307,4	5,4	3,0	Benzodiazepinlignende
Morfin	$C_{17}H_9NO_3$	285,3	9,1	0,9	Opioid
Kodein	$C_{18}H_{21}NO_3$	299,4	9,2	1,3	Opioid
Oksykodon	$C_{18}H_{21}NO_4$	315,4	7,6	1,6	Opioid
Tramadol	$C_{16}H_{25}NO_2$	263,4	9,6	2,5	Opioid
Metadon	$C_{21}H_{27}NO$	309,5	9,1	3,9	Opioid
Kokain	$C_{17}H_{21}NO_4$	303,4	9,0	2,3	Sentralstimulerende rusmiddel
Amfetamin	$C_9H_{13}N$	135,2	10,1	1,8	Sentralstimulerende rusmiddel
Metamfetamin	$C_{10}H_{15}N$	149,2	10,4	2,2	Sentralstimulerende rusmiddel
MDMA	$C_{11}H_{15}NO_2$	193,3	10,1	1,9	Sentralstimulerende rusmiddel
Fentanyl	$C_{22}H_{28}N_2O$	336,5	8,8	3,8	Opioid
THC	$C_{21}H_{30}O_2$	314,5	-	5,9	Dempende rusmiddel
Buprenorfin	$C_{29}H_{41}NO_4$	467,6	9,6	3,6	Opioid



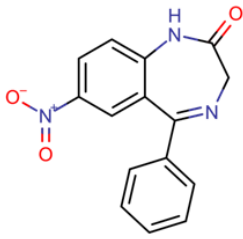
Alprazolam



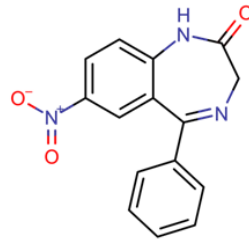
Diazepam



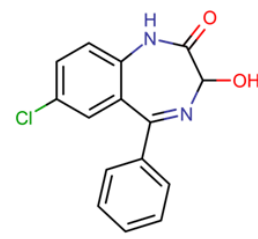
Flunitrazepam



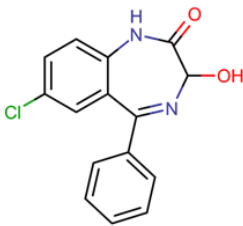
Klonazepam



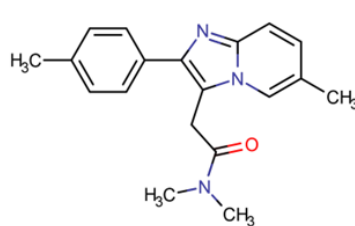
Nitrazepam



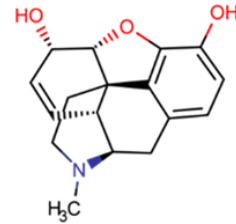
Oxazepam



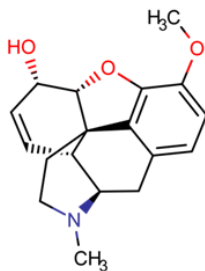
Zopiklon



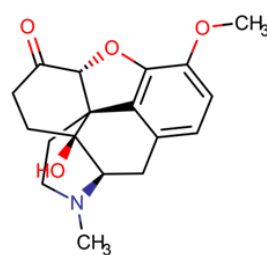
Zolpidem



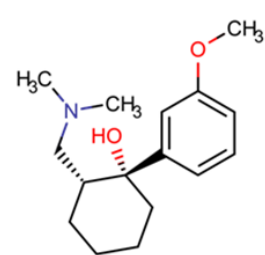
Morfin



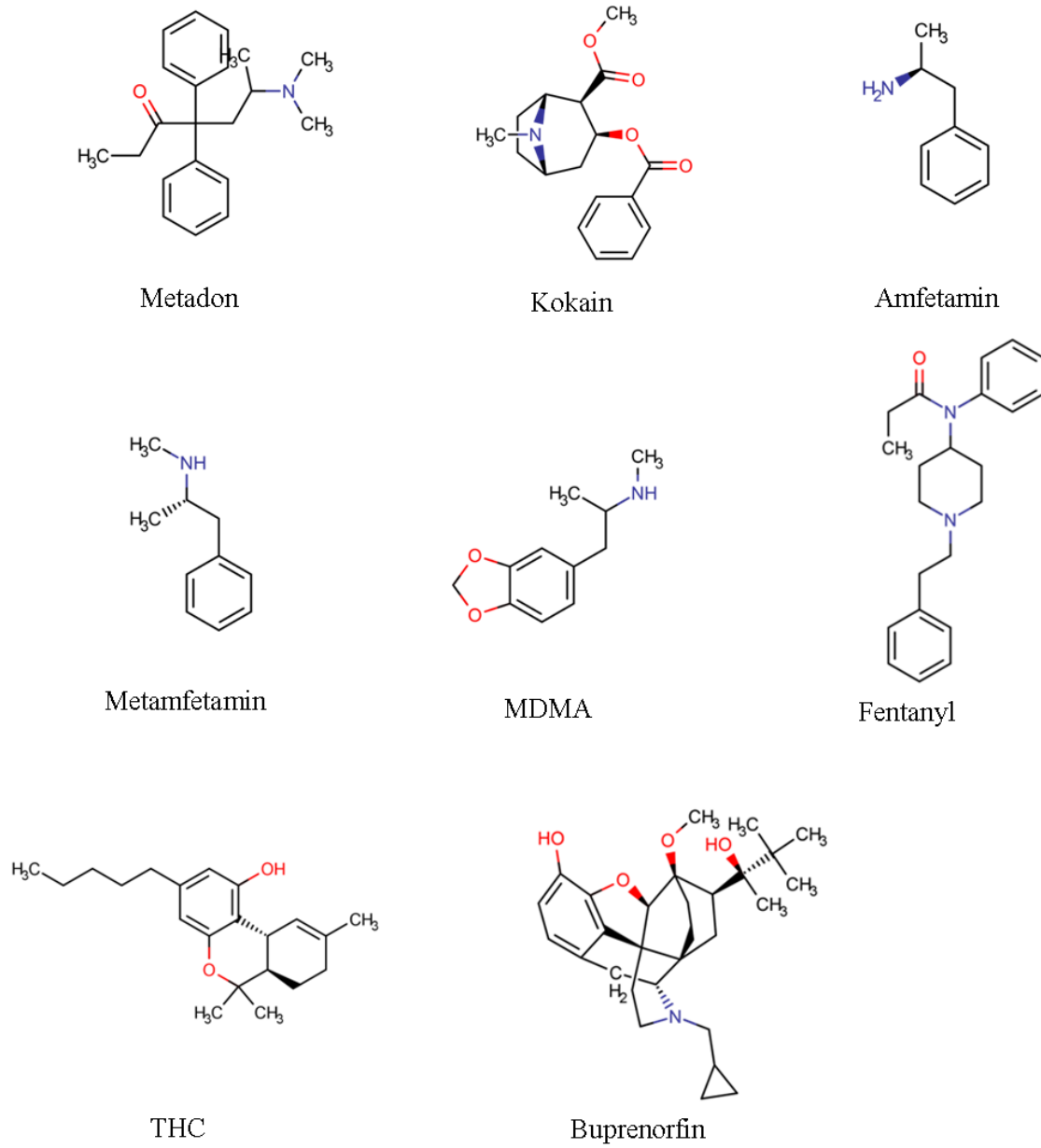
Kodein



Oksykodon



Tramadol



Figur 3.1: Analyttenes strukturer [41]

3.2 Utstyr

Utstyr som ble brukt i oppgaven er oppsummert i **tabell 3.2–3.4**.

Tabell 3.2: PALME-oppsett

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	Produksjonssted
Donorplate	96 well plates, 0,50ml polypropylen	Agilent	Santa Clara, CA, USA
Akseptorplate og topplokk	MAIPN4550 96-well IP. Clear plates. Non-sterile. Filter Plate with 0,45µm pore size, hydrophobic High protein binding immobilon-P membrane.	Merck Millipore	Darmstadt, Tyskland
Forseglingsfilm	Platemax pierceable Aluminium Sealing Film, non-sterile, aluminium foil.	Axygen	Central Avenue Union City, CA, USA

Tabell 3.3: Diverse forbruksmateriell

Forbruksmateriell	Beskrivelse	Produsent	Produksjonssted
Insert	Micro-Insert, 0,1 mL, clear glass 15 mm, top	VWR	Radnor, PA, USA
Vial i glass	32×11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Vial i plast	Polypropylene vial with snap cap, 300 µl, PFTE/ silicon sept a	Waters	Milford, MA, USA
Eppendorfrør	Safe-Lock tubes 2,0 ml	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Plastrør	Tube, 4.5 ml, 75×12 mm, conical base, PP	Sarstedt	Hildesheim, Tyskland
96-brønnsplate til autosampler	Nunc 96-well Polypropylene MicroWell Plates, non-sterile, 450 µl, V-bottom	Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY, USA
Forseglingsfilm	Rapid Slit Seal 80 mm×122 mm non-sterile	Biochromato	Kanagawa-ken, Japan
Reagent reservoir til 96-kanalpipette	Non-sterile, low profile 96 pyramidal	Mettler-Toledo	Oakland, CA, USA

	bottoms		
Pipettespisser til finnpipette uten filter	Optifit Refill Tips	Sartorius	Helsinki, Finland
Pipettespisser til finnpipette med filter	Barrier tip, Filtered, Sterile, 96 tips, 200 μ l	Thermo Fisher Scientific	Rochester, NY, USA
Pipettespisser til multipipette	Eppendorf	Labsystems	Vantaa, Finland
Pipettespisser til 96-kanalpipette	Liquidator 96-well Platform Tips, Max. Volume: 200 μ l	Mettler-Toledo	Oakland, CA, USA
VAMS	20 μ l Mitra Microsampler 4-sampler clamshell	Neoteryx, LLC.	Torrance, CA, USA
VAMS	20 μ l Mitra Microsampler 96-Rack Box	Neoteryx, LLC.	Torrance, CA, USA

Tabell 3.4: Diverse utstyr

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	Produksjonssted
Analysevekt	AE200	Mettler-Toledo	Oslo, Norge
Analysevekt	XP 205	Mettler-Toledo	Oslo, Norge
Vortexmixer	MS3 digital	IKA	Wilmington, NC, USA
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph	Schwabach, Tyskland
96-kanalpipette	Liquidator 96-channel Manual, Pipetting system, 5–200 μ l	Mettler Toledo	Oakland, CA, USA
Finpipette	Biohit	Labsystems	Vantaa, Finland
Multipipette	Xstream Eppendorf Multipipette	VWR	Radnor, PA, USA
pH meter	pH 211 Microprocessor pH meter	Hanna instruments	Woonsocket, RI, USA

3.3 Kjemikalier

Tabell 3.5–6 oppsummerer analyttene og internstandardene som er brukt i oppgaven. I **tabell 3.7** er alle kjemikaliene som har blitt testet i ekstraksjonsoppsettet oppsummert.

Tabell 3.5: Analyttene

Kjemikalie	Renhet (%)	Produsent	Produksjonssted
Amfetamin	98,8	Chiron	Trondheim, Norge
Metamfetamin	100	Chiron	Trondheim, Norge
MDMA	100	Lipomed	Arlesheim, Nederland
THC	100	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Morfin	100	Chiron	Trondheim, Norge
Kokain	100	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Kodein	100	Chiron	Trondheim, Norge
Metadon	100	Chiron	Trondheim, Norge
Buprenorfin	99,5	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Oksykodon	100	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Diazepam	99,5	Chiron	Trondheim, Norge
Fentanyl	100	Cerilliant	Round Rock, Texas, USA
Oksazepam	99,8	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Klonazepam	99	Sigma	Steinheim, Tyskland
Flunitrazepam	99,5	Chiron	Trondheim, Norge
Nitrazepam	99,4	Chiron	Trondheim, Norge
Alprazolam	95,2	Chiron	Trondheim, Norge
Tramadol	99,8	Sigma	Steinheim, Tyskland
Zopiklon	99,6	Lipomed	Arlesheim, Nederland
Zolpidem	80 (korr. for renhet)	Lipomed	Arlesheim, Nederland

Tabell 3.6: Internstandarder

Kjemikalie	Produsent	Produksjonssted
¹³ C ₆ -amfetamin	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₆ -metamfetamin	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₆ MDMA	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₄ -THC	Chiron	Trondheim, Norge
Morfin-d3	Sigma-Aldrich	St.Louis, MO, USA
¹³ C ₆ -kokain	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₂ - Kodein	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₆ -metadon	Chiron	Trondheim, Norge
Buprenorfin-d4	Cerillant	Round Rock, Texas, USA
Oksykodon-d3	Cerillant	Round Rock, Texas, USA
¹³ C ₆ -diazepam	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₆ -oksazepam	Chiron	Trondheim, Norge
¹³ C ₆ -klonazepam	Chiron	Trondheim, Norge
Flunitrazepam-d7	Cerillant	Round Rock, Texas, USA
¹³ C ₆ -nitrazepam	Chiron	Trondheim, Norge
Alprazolam-d5	Toronto research chemicals	Toronto, Canada
Tramadol- ¹³ C-d3	Chiron	Trondheim, Norge
Zopiklon-d8	Toronto research	Toronto, Canada

	chemicals	
Zolpidem-d6	Cerillant	Round Rock, Texas, USA

Tabell 3.7: Diverse kjemikalier

Kjemikalie	Kvalitet	Produsent	Produksjonssted
Bis(2etylhexyl)fosfitt	96 %	Sigma- Aldrich	St.Louis, MO, USA
Dihexyleter	97 %	Sigma- Aldrich	St.Louis, MO, USA
Dimetylsulfoksid	Dried (max.0,05 % H ₂ O)	Merck	Darmstadt, Tyskland
Dodecylacetat	98 %	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
Trioctylamin	Alamine 300	Cognis	Cincinnati, OH, USA
6-undekanon	99 %	Sigma- Aldrich	St.Louis, MO, USA
Natriumhydroksid	99,3 %	VWR	Radnor, PA, USA
Undecanol	99 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Heksadekan	99 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Dietylhelxylfosfat	-	Fluka AG	Buchs, Sveits
Dinatriumhydrogenfosfat	98–101 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumhydrogenfosfat	98–101 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Eddiksyre	≥ 99,7 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Trifluoreddiksyre	≥ 98 %	Sigma- Aldrich	St. Louis, MO, USA
Natriumhydrogenkarbonat	≥ 99,5 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Natriumkarbonat	≥ 99,9 %	Merck	Darmstadt, Tyskland
Ammoniumkarbonat	For analyse	Merck	Darmstadt, Tyskland

Acetonitril	HPLC Far UV Gradient grade	J.T. Baker	Phillipsburg, New Jersey
Amoniakk	Ammonia solution 32 %, extra pure	Merck	Darmstadt, Tyskland
Metanol	LC-MS \geq 99,9 %	Honeywell	Seelze, Tyskland

3.4 Løsninger

3.4.1 Stamløsninger

Stamløsninger til innledende optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger: Stamløsninger var tilgjengelig fra Oslo universitetssykehus (OUS). amfetamin, MDMA, kodein og morfin var løst i metanol. Buprenorfin var løst i en blanding av metanol og 10 mM ammoniumformat 1:9 (v/v). To stamløsninger med THC ble brukt, en løst i etanol og en i metanol.

Stamløsninger til validering: Stamløsninger var tilgjengelig fra OUS. Amfetamin, metamfetamin, MDMA, morfin, kokain, kodein, metadon, buprenorfin, oksykodon, diazepam, fentanyl, oksazepam, klonazepam, flunitrazepam, nitrazepam og alprazolam var løst i metanol. THC var løst i etanol, zolpidem var løst i metanol:acetonitril 50:50 (v/v) og zopiklon var løst acetonitril.

3.4.2 Arbeidsløsning

Metodeoptimalisering: Det ble laget en konsentrert arbeidsløsning av hver av de seks stamløsningene som ble brukt til metodeoptimalisering. Arbeidsløsningene ble laget til en konsentrasjon på 1 $\mu\text{g/ml}$ i 10 ml Mobilfase A, HCOOH:MeOH 95:5 (v/v). Arbeidsløsningene ble brukt for MS/MS-optimalisering og for metodeoptimalisering.

Arbeidsløsning for optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger: Det ble laget en konsentrert arbeidsløsning av stamløsningene. Konsentrasjon av analytter i arbeidsløsningen ble laget til 10 $\mu\text{g/ml}$ i metanol.

Arbeidsløsning for optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver:

Arbeidsløsning av analyttene var tilgjengelig fra OUS. Atten analytter var løst i MeOH:EtOH 2:1 (v/v), i kolber som var syrevasket med HNO₃. Zopiklon og zolpidem ble løst i acetonitril, fordi zopiklon er ustabil i metanol. De er begge følsomme for lys, og ble derfor oppbevart i en glassbeholder som er dekket med aluminiumsfolie for å beskytte mot lys.

Arbeidsløsning for validering: Alle analyttene ble først løst i ACN:H₂O 30:70 (v/v). Zopiklon tålte ikke betingelsene, og ble derfor løst i acetonitril.

Arbeidsløsning med 1 M NaOH: Laget ved å løse 4 g NaOH i 100 ml Milli-Q-vann.

Løsning med 10 mM NaOH: Laget ved å tilsette 500 µl 1 M NaOH i 50 ml Milli-Q-vann.

Løsning med 20 mM HCOOH: Laget ved å tilsette 77,4 µl maursyre til 100 ml Milli-Q-vann.

Løsning med 200 mM HCOOH: Laget ved å tilsette 774 µl maursyre til 100 ml Milli-Q-vann.

Løsning med 100 mM HCOOH: Laget ved å fortynne 200 mM maursyre 50:50 (v/v) med Milli-Q-vann.

Løsning med DMSO: 100 mM HCOOH: Det ble laget løsninger i forholdene 50:50 (v/v) og 25:75 (v/v).

Løsning med DMSO: 200 mM HCOOH: Det ble laget løsninger i forholdene 75:25 (v/v), 50:50 (v/v) og 60:40 (v/v).

Løsning med 25 mM fosfatbuffer: Laget ved å fortynne en tilgjengelig 50 mM fosfatbuffer 50:50 (v/v) med Milli-Q-vann og kontrollere pH med pH-meter. pH ble målt til 7,47.

Løsning med 0,2 M Ammoniumkarbonatbuffer: Laget ved å løse 15,7 g ammoniumkarbonat i 500 ml Milli-Q-vann, måle pH med kalibrert pH-meter og justere pH til 9,3 med ammoniakk.

3.4.3 Standarder og kontroller

Standarder og kontroller for optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver

Fra arbeidsløsninger tilgjengelig på OUS ble det tillaget standarder og kontroller i ulike konsentrasjoner. Det ble laget standarder med høy, medium og lav konsentrasjon (**tabell 3.8**), og kontroller med lav og høy konsentrasjon (**tabell 3.9**), ved å fortynne arbeidsløsningen med Milli-Q-vann (A). Arbeidsløsningen med zopiklon og zolpidem ble fortynnet med ACN:H₂O 30:70 (v/v) (B). Standarder og kontroller ble fortynnet i fullblod i forholdet, 12,5 % A + 12,5 % B +75 % blod, i hvert sitt rør for hver konsentrasjon standard og kontroll.

Tabell 3.8: Konsentrasjon (µM) av standarder i blod.

Komponent	Høy A	Medium A	Lav A
Amfetamin	0,50	0,15	0,020
Metamfetamin	0,50	0,15	0,020
MDMA	0,50	0,15	0,020
THC	0,050	0,015	0,0020
Morfin	0,51	0,15	0,020
Kokain	0,13	0,038	0,0049
Kodein	0,51	0,15	0,020
Metadon	0,50	0,15	0,019
Buprenorfin	0,050	0,015	0,0020
Oksykodon	0,50	0,15	0,020
Benzoylecgonin	0,25	0,075	0,010
Diazepam	0,51	0,15	0,020

Oksazepam	1,26	0,38	0,049
Klonazepam	0,10	0,030	0,0039
Flunitrazepam	0,13	0,038	0,0049
Nitrazepam	0,51	0,15	0,020
Alprazolam	0,25	0,076	0,010
Tramadol	0,51	0,15	0,020
	Høy B	Medium B	Lav B
Zolpidem	0,50	0,15	0,020
Zopiklon	0,50	0,15	0,020

Tabell 3.9: Konsentrasjon (μM) av kontroller i blod.

Komponent	Høy A	Lav A
Amfetamin	0,25	0,025
Metamfetamin	0,25	0,025
MDMA	0,25	0,025
THC	0,0025	0,00025
Morfin	0,038	0,0038
Kokain	0,0063	0,00063
Kodein	0,038	0,0038
Metadon	0,076	0,0076
Buprenorfin	0,0025	0,00025
Oksykodon	0,063	0,0063
Benzoylcegonin	0,25	0,025
Diazepam	0,25	0,025
Oksazepam	0,63	0,063
Klonazepam	0,0050	0,00050
Flunitrazepam	0,0064	0,00064

Nitrazepam	0,063	0,0063
Alprazolam	0,013	0,0013
Tramadol	0,25	0,025
	Høy B	Lav B
Zolpidem	0,088	0,0088
Zopiklon	0,025	0,0025

Internstandarder

Internstandard tilsettes for å korrigere for tilfeldige endringer som kan skje under prøveopparbeidelsen. Hvilke internstandarder og hvilke konsentrasjoner internstandard har i blodprøvene i denne oppgaven er presentert i **tabell 3.10**.

Tabell 3.10: Konsentrasjon (μM) i blod for internstandard.

Kjemikalie	Konsentrasjon i (μM)
$^{13}\text{C}_6$ -amfetamin	0,020
$^{13}\text{C}_6$ -metamfetamin	0,020
$^{13}\text{C}_6$ MDMA	0,020
$^{13}\text{C}_4$ -THC	0,016
Morfin-d3	0,019
$^{13}\text{C}_6$ -kokain	0,020
$^{13}\text{C}_2$ -Kodein	0,020
$^{13}\text{C}_6$ -metadon	0,020
Buprenorfin-d4	0,004
Oksykodon-d3	0,020
$^{13}\text{C}_6$ -diazepam	0,020
$^{13}\text{C}_6$ -oksazepam	0,020
$^{13}\text{C}_6$ -klonazepam	0,020
Flunitrazepam-d7	0,004
$^{13}\text{C}_6$ -nitrazepam	0,020
Alprazolam-d5	0,008
Tramadol- ^{13}C -d3	0,020
Zopiklon-d8	0,020

Standarder og kontroller for validering

For valideringen ble standardområdet utvidet, og det ble tillaget standarder og kontroller for flere konsentrasjoner. For valideringen ble enheten μM byttet ut med ng/ml.

Standard 1-6 ble laget ved å tilsette 50 μl standard (1-6) og 25 μl standard med zopiklon (1-6) til 425 μl fullblod. Konsentrasjon av standard i blod er oppgitt i **tabell 3.11**. Kontrollene ble laget fra de samme arbeidsløsningene som standardene. Kontroll 4 ble laget fra standard 6, kontroll 3 fra standard 5, kontroll 3 fra standard 3 og kontroll 1 fra standard 2.

Konsentrasjonene til kontrollene i blod er oppgitt i **tabell 3.12**.

I valideringen ble det utført et forsøkt for å bestemme minste detekterbare konsentrasjon (MDK). Standard 1 ble fortynt fem, ti, 20 og 100 ganger. Konsentrasjonene av analyttene i blod er oppgitt i **tabell 3.13**.

VAMS ble dyppet i rør med standard eller kontroll i fullblod. «Prøvesvampen» skal absorbere nøyaktig 20 μl blod. Prøvene ble tørket ved romtemperatur.

Tabell 3.11: Konsentrasjoner (ng/ml) i blod i standarder

Forbindelse	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Standard 6
THC	0,5	1	2,5	5	25	50
Diazepam	1	2	5	10	50	100
Oksazepam	5	10	25	50	250	500
Klonazepam	1	2	5	10	50	100
Flunitrazepam	1	2	5	10	50	100
Nitrazepam	1	2	5	10	50	100
Alprazolam	1	2	5	10	50	100
Zopiklon	1	2	5	10	50	100
Zolpidem	1	2	5	10	50	100
Morfin	5	10	25	50	250	500
Kodein	5	10	25	50	250	500
Oksykodon	5	10	25	50	250	500
Tramadol	5	10	25	50	250	500
Metadon	5	10	25	50	250	500
Buprenorfin	1	2	5	10	50	100
Kokain	1	2	5	10	50	100
Fentanyl	0,2	0,4	1	2	10	20
Amfetamin	5	10	25	50	250	500
Metamfetamin	5	10	25	50	250	500
MDMA	5	10	25	50	250	500

Tabell 3.12: Konsentrasjoner (ng/ml) i blod i kontroller

Forbindelse	Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
THC	0,75	1,5	12,5	37,5
Diazepam	1,5	3	25	75
Oksazepam	7,5	15	125	375
Klonazepam	1,5	3	25	75
Flunitrazepam	1,5	3	25	75
Nitrazepam	1,5	3	25	75
Alprazolam	1,5	3	25	75
Zopiklon	1,5	3	25	75
Zolpidem	1,5	3	25	75
Morfin	7,5	15	125	375
Kodein	7,5	15	125	375
Oksykodon	7,5	15	125	375
Tramadol	7,5	15	125	375
Metadon	7,5	15	125	375
Buprenorfin	1,5	3	25	75
Kokain	1,5	3	25	75
Fentanyl	0,3	0,6	5	15
Amfetamin	7,5	15	125	375
Metamfetamin	7,5	15	125	375
MDMA	7,5	15	125	375

Tabell 3.13: Konsentrasjoner (ng/ml) i blod ved MDK forsøk:

Forbindelse	MDK1	MDK2	MDK3	MDK4
THC	0,1	0,05	0,025	0,005
Diazepam	0,2	0,1	0,05	0,01
Oksazepam	1	0,5	0,25	0,05
Klonazepam	0,2	0,1	0,05	0,01
Flunitrazepam	0,2	0,1	0,05	0,01
Nitrazepam	0,2	0,1	0,05	0,01
Alprazolam	0,2	0,1	0,05	0,01
Zopiklon	0,2	0,1	0,05	0,01
Zolpidem	0,2	0,1	0,05	0,01
Morfin	1	0,5	0,25	0,05
Kodein	1	0,5	0,25	0,05
Oksykodon	1	0,5	0,25	0,05
Tramadol	1	0,5	0,25	0,05
Metadon	1	0,5	0,25	0,05
Buprenorfin	0,2	0,1	0,05	0,01
Kokain	0,2	0,1	0,05	0,01
Fentanyl	0,04	0,02	0,01	0,002
Amfetamin	1	0,5	0,25	0,05
Metamfetamin	1	0,5	0,25	0,05
MDMA	1	0,5	0,25	0,05

3.4.4 Fullblod

Fullblod ble levert fra blodbanken ved Ullevål sykehus. Det ble oppbevart ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ og tint før bruk. Det opptinte blodet ble oppbevart i kjøleskap ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.4.5 Organisk væskemembran

Rene organiske løsemidler som ble benyttet som organisk væskemembran var tilgjengelige fra Farmasøytisk institutt. Organisk væskemembran som bestod av undekanon og dihexyleter i forholdet 1:1 med 1 % trioktylamin (TOA) (w/w/w) ble laget ved først å veie inn 0,01 g TOA i en beholder. Det ble deretter veid inn undekanon og dihexyleter i forholdet 1:1 (w/w), slik at løsningen inneholdt lik mengde av de to stoffene, og totalvekt på løsningen ble 1 g. Flere organiske væskemembraner ble tillaget på tilsvarende måte.

3.4.6 Mobilfaser

Analyse med LC-ITMS

Mobilfase A HCOOH:MeOH 95:5 (v/v): Det ble først laget 20 mM HCOOH ved å tilsette 774 μl til 1000 ml Milli-Q-vann. Det ble tatt ut nøyaktig 50 μl 20 mM HCOOH. Deretter ble det tilsatt 50 ml MeOH.

Mobilfase B HCOOH:MeOH 5:95 (v/v): Det ble målt opp 1000 ml MeOH i en 1000 ml målekolbe. Det ble tatt ut nøyaktig 50 ml fra målekolben, slik at det var igjen 950 ml. Det ble deretter tilsatt 50 ml 20 mM HCOOH, som ble tatt ut ved tillaging av mobilfase A.

Analyse med LC- QqQ

Mobilfase A 10 mM ammonium format buffer pH 3,1: laget ved å fortynne en 100 mM stamløsning 1:10 (v/v) med Milli-Q-vann. Stammløsningen ble oppbevart i kjøleskap ved $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Mobilfase B metanol 100 %

3.5 Instrumentelle betingelser

To ulike UHPLC-MS/MS instrumenter ble brukt for kromatografisk separasjon og deteksjon i denne oppgaven. De innledende forsøkene og de fleste optimaliseringsforsøkene ble gjort på en UHPLC med lineær ionefelle (LC-ITMS) som masseanalysator på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, UiO. Siste del av optimaliseringsforsøkene og metodevalideringen ble utført på en UHPLC med trippel kvadrupol (LC-QqQ) som masseanalysator på Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS.

3.5.1 LC-ITMS

UHPLC betingelser

Systemet for kromatografisk separasjon på UHPLC bestod av Dionex UltiMate 3000 WPS TSR autosampler, HPG 3400 RS pumpe, TCC 3000 RS kolonneovn og SRD 3600 degasser fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA). Separasjonen ble utført på en Acquity UPLC® HSS T3 kolonne, med en diameter på 2,1×100 mm og 1,8 µm partikler med en porestørrelse på 100 Å fra Waters (Milford, MA, USA). Injeksjonsvolumet ble satt til 5 µl. Den kromatografiske separasjonen ble utført ved 40 °C, og tok totalt 9 minutter. Mobilfasene som ble brukt bestod av 95 % 20 mM HCOOH i Milli-Q-vann med 5 % MeOH (mobilfase A), og 5 % 20 mM HCOOH i Milli-Q-vann med 95 % MeOH (mobilfase B). Mobilfasens gradient er oppsummert i **tabell 3.14**.

Tabell 3.14: Mobilfasens gradient.

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	95	5	0,3
5,00	0	100	0,3
6,00	0	100	0,3
6,10	95	5	0,3
9,00	95	5	0,3

MS betingelser

Massespektrometri ble utført ved bruk av en LTQ XL MS (San Jose, CA, USA). Det ble utført ESI i positiv modus. Sprayspenningen var 5 kV og kapillærtemperaturen 350 °C. Prøven ble forstøvet av nitrogen gass (*Sheat gas flow* 24 AU), som strømte ut av ESI-dysen, hvor den kom i kontakt med prøveløsningen på enden av nålen. Her ble prøven forstøvet til en fin aerosol. *Auxiliary gas flow* (10 AU) kom ut fra en ytre ring i ESI-dysen, og hjalp til med å forstøve prøven. Deteksjonen av analyttene ble utført ved bruk av *selected reaction monitoring* (SRM). For å oppnå flere datapunkter over toppene, ble overgangene delt inn i fem segmenter. Segmentene ble basert på retensjonstid; de analyttene som eluerte nært hverandre ble lagt i samme segment. Overgang og kollisjonsenergi for analyttene er oppgitt i **tabell 3.15**.

Tabell 3.15: Overgang (Da) og Kollisjonsenergi (eV) for analyttene.

Analytt	Overgang (Da)	Kollisjonsenergi(eV)
Morfin	286,4 > 201,0 286,4 > 229,0 286,4 > 268,1	24
Kodein	300,4 > 215,0 300,4 > 243,1 300,4 > 282,5	23
Amfetamin	136,2 > 119,0	23
MDMA	194,3 > 162,5	20
Buprenorfin	486,7 > 396,3 486,7 > 414,3	20
THC	315,3 > 193,1 315,3 > 259,2	20

MS/ MS-optimalisering

En sprøytepumpe ble fylt opp med 500 µl analytt i konsentrasjon 1 µg/ml. Ved hjelp av T-koplet slange ble mobilfasen og analytt fra sprøytepumpen blandet før infusjon i ionekilden. Mobilfasen som bestod av mobilfase A: Mobilfase B 80:20 (v/v), ble pumpet gjennom systemet med en *flow* på 0,3 ml/min. Moder-ion-massen til analytten som skulle optimaliseres ble selektert i massespektrometeret. Ved stabilt signal ble kollisjonsenergien justert slik at analytten ble fragmentert og responsen til moderionet var redusert til 10–15 % av opprinnelig

signal. Det ble gjort en automatisk tuning, som bestemte riktige betingelser for analytten. Dette ble gjentatt for hver av de seks analyttene. Mellom hver analytt ble sprøytepumpen skylt ren med metanol.

Metodeoptimalisering

Hver av de seks arbeidsløsningene, med konsentrasjon 1 µg/ml (se **avsnitt 3.4.2**) ble fortynnet til 167 ng/ml i Mobilfase A, HCOOH:MeOH 95:5(v/v). Fortynningene ble overført til prøveglass, og analysert på LC-ITMS.

Metodeoptimaliseringen ble startet med et enkelt segment for alle seks analyttene. For hver analytt ble det lagt til et *scan event*, hvor informasjon om molekylvekt til moderionet (m/z), kollisjonsenergi, samt fragmenter ble lagt inn. Denne informasjonen ble innhentet ved MS/MS-optimalisering. Ved å analysere analyttene hver for seg kan man skille alle fra hverandre og vite med sikkerhet hvilken retensjonstid hver enkelt analytt har. Når retensjonstiden til analyttene var bestemt, ble metoden delt opp i fem ulike segmenter. Fire av segmentene hadde ett *scan event*, og ett av segmentene hadde to *scan events* ettersom retensjonstidene lå nært hverandre.

3.5.2 LC-QqQ

UHPLC betingelser

En Waters Acquity UHPLC (Milford, MA, USA) ble brukt for kromatografisk separasjon. Kolonnen som ble brukt var en Kinetex® Biphenyl (100×2.1 mm indre diameter) med partikkelstørrelse 1,7 µm og en porestørrelse på 100 Å, fra Phenomenex (Torrance, CA, USA). Kolonnetemperaturen var satt til 60 °C. Injeksjonsvolum var 5 µl, og tid mellom hver injeksjon var 8 min (*cycle time*). Injeksjonen ble utført med et *Flow through needle* system. *Strong wash* som bestod av metanol og vann i forholdet 90:10, vasket utsiden av nålen i to sekunder før injeksjon og i seks sekunder etter injeksjon. *Purge solvent* som bestod av metanol og vann i forholdet 10:90, var ikke i kontakt med prøven, og ble bare brukt i sprøyten som trakk opp volumet. Nålen ble vasket ved at gradienten gikk gjennom den. Metanol 100 % (mobilfase B) og 10 mM ammonium format buffer pH 3,1 (mobilfase A) ble benyttet som mobilfaser. Mobilfasesammensetningen ble endret underveis i separasjonen (gradienteluering). Gradienten er oppsummert i **tabell 3.16**.

Tabell 3.16: Mobilfasens gradient

Tid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	98	2	0,5
0,20	98	2	0,5
0,30	75	25	0,5
4,00	30	70	0,5
5,00	1	99	0,5
6,20	1	99	0,5
6,30	98	2	0,5

MS betingelser

ESI-MS/MS deteksjon ble utført på et TQS tandem masse-spektrometer, fra Waters (Milford, MA, USA). Det ble brukt ESI med positiv ionisering og scan i *multiple reaction monitoring* (MRM) modus.. Spenningen i ionekilden var 1,35 kV, og kapillærttemperaturen 150 °C. Trykket i kollisjonscellen var 0,0043 mbar. Nitrogen (tørkegass) ble tilført i en hastighet på 1000 L/h, ved 500 °C. *Cone gas flow* var satt til 300 L/h. Overgang, *cone voltage* og kollisjonsenergi for analyttene og internstandardene er oppgitt i henholdsvis **tabell 3.17** og **3.18**.

Tabell 3.17: Overgang, cone voltage og kollisjonsenergi for analyttene.

Analytt	Internstandard	Retensjonstid	Overgang (Da)	<i>Cone voltage</i> (v)	Kollisjonsenergi (eV)
Alprazolam	Alprazolam-d5	4,45	309,09 > 205,10	45	40
			309,09 > 281,10	45	25
Diazepam	¹³ C ₆ -diazepam	4,77	285,08 > 154,00	45	30
			285,08 > 193,00	45	30
Flunitrazepam	Flunitrazepam-d7	4,24	314,09 > 239,10	45	30
			314,09 > 268,10	45	25
Klonazepam	¹³ C ₆ -klonazepam	3,83	316,05 > 241,10	40	35
			316,05 > 270,10	40	25
Nitrazepam	¹³ C ₆ -nitrazepam	3,80	282,09 > 207,10	35	30
			282,09 > 236,10	35	25
Oksazepam	¹³ C ₆ -oksazepam	3,88	287,06 > 241,05	25	25
			287,06 > 269,10	25	15
Zopiklon	Zopiklon-d8	2,35	389,10 > 217,10	16	36
			389,10 > 245,00	16	14
Zolpidem	Zolpidem-d6	3,06	308,10 > 219,10	42	50
			308,10 > 235,20	42	36
Morfin	Morfin-d3	1,01	286,14 > 201,06	40	25
			286,14 > 209,06	40	25

Kodein	¹³ C ₂ -Kodein	1,40	300,16 > 199,08	40	25
			300,16 > 215,07	40	25
			300,16 > 225,09	40	25
Oksykodon	Oksykodon-d3	1,51	316,15 > 241,09	25	30
			316,15 > 298,14	25	25
Tramadol	¹³ C-d3-tramadol	2,15	264,20 > 58,00	20	14
			264,20 > 246,20	20	12
Metadon	¹³ C ₆ -metadon	4,07	310,22 > 223,10	20	25
			310,22 > 265,16	20	15
Kokain	¹³ C ₆ -kokain	2,43	304,15 > 150,09	30	25
			304,15 > 182,12	30	20
Amfetamin	¹³ C ₆ -amfetamin	1,31	136,11 > 91,05	15	15
			136,11 > 119,09	15	5
Metamfetamin	¹³ C ₆ -metamfetamin	1,46	150,13 > 91,05	15	15
			150,13 > 119,09	15	10
MDMA	¹³ C ₆ -MDMA	1,58	194,12 > 133,07	20	20
			194,12 > 163,08	20	15
Fentanyl	Oksykodon-d3	3,21	337,20 > 105,10	30	25
			337,20 > 188,10	30	15
THC	¹³ C ₄ -THC	5,27	315,23 > 123,12	15	40
			315,23 > 193,12	15	25
Buprenorfin	Buprenorfin-d4	3,37	468,31 > 396,22	60	35
			468,31 > 414,26	60	35

Tabell 3.18: Overgang, cone voltage og kollisjonsenergi for internstandardene.

Internstandard	Overgang (Da)	Cone (v)	Koll (eV)
Alprazolam-d5	314,10 > 211,10	45	40
	314,10 > 286,10	45	25
¹³ C ₆ -diazepam	291,10 > 160,02	45	30
	291,10 > 199,02	45	30
Flunitrazepam-d7	321,10 > 246,10	45	30
	321,10 > 275,10	45	25
¹³ C ₆ -klonazepam	322,07 > 247,12	40	35
	322,07 > 276,12	40	25
¹³ C ₆ -nitrazepam	324,07 > 249,12	40	35
	324,07 > 278,12	40	25
¹³ C ₆ -oksazepam	288,20 > 213,10	35	30
	288,20 > 242,10	35	25
Zopiklon-d8	293,08 > 247,07	25	25
	293,08 > 275,07	25	15
Zolpidem-d6	397,20 > 217,00	16	30
	397,20 > 245,00	16	20
Morfin-d3	314,20 > 219,20	42	50
	314,20 > 235,20	42	36
¹³ C ₂ -kodein	289,16 > 201,06	40	25
	289,16 > 209,06	40	25
Oksykodon-d3	303,17 > 217,07	40	25

	303,17 > 227,09	40	25
¹³ C-d3-tramadol	319,17 > 244,10 319,17 > 301,17	25 25	30 25
¹³ C ₆ -metadon	368,20 > 58,00 268,20 > 250,20	20 20	14 12
¹³ C ₆ -kokain	316,24 > 229,12 316,24 > 271,18	20 20	25 15
¹³ C ₆ -amfetamin	310,17 > 150,09 310,17 > 182,12	30 30	25 20
¹³ C ₆ -metamfetamin	142,13 > 97,07 142,13 > 125,11	15 15	15 5
¹³ C ₆ -MDMA	156,15 > 97,05 156,15 > 125,11	15 15	15 10
Oksykodon-d3	200,14 > 139,09 200,14 > 169,10	20 20	20 15
¹³ C ₄ -THC	319,23 > 123,10 319,23 > 197,14	15 15	40 25
Buprenorfin-d4	472,34 > 400,24 472,34 > 414,26	60 60	40 40

3.6 Utførelse av PALME

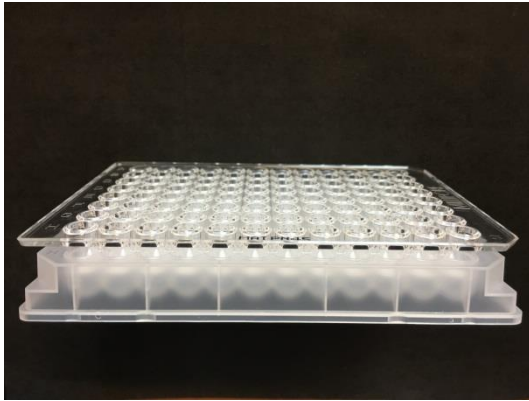
Det ble innledningsvis forsøkt utviklet en metode for ekstraksjon med PALME av THC, amfetamin, MDMA, buprenorfin, kodein og morfin fra vandige prøver (**avsnitt 3.6.1**). Fjorten nye analytter ble inkludert i metoden, og videre optimalisering ble utført i fullblod (**avsnitt 3.6.2**). Da de beste betingelsene var bestemt, ble metoden validert for blodprøver tatt med VAMS, og brukt på reelle prøver (**avsnitt 3.6.3**). Fremgangsmåte for ekstraksjon utført med vandige prøveløsninger, prøveløsninger tilsatt fullblod, og for validering og reelle prøver er beskrevet i avsnittene under.

3.6.1 PALME fra vandige prøver

Fra stamløsninger med THC, amfetamin, MDMA, buprenorfin, kodein og morfin ble det laget en arbeidsløsning i en konsentrasjon på 10 µg/ml (se **avsnitt 3.4.2**). Før hver ekstraksjon ble 200 µl arbeidsløsning overført til en ny kolbe og fortynnet til en konsentrasjon på 200 ng/ml med donorløsning. Det ble laget en referanseløsning fra samme arbeidsløsning, løst i samme akseptorløsning som ble brukt i ekstraksjonen. Konsentrasjon av analyttene i referanseløsningen ble laget slik at den var lik konsentrasjon av analyttene i akseptorløsningen etter ekstraksjonen, dersom man antar 100 % utbytte.

Til hver donorbrønn ble det tilsatt 250 μl prøveløsning. Akseptorplaten ble snudd slik at filtermembranen vendte opp, og 3 μl organisk væskemembran ble applisert på membranen. Akseptorplaten ble snudd tilbake igjen og 50/100 μl akseptorløsning ble tilsatt i akseptorbrønningen. Før ekstraksjon ble donor- og akseptorplaten klemt sammen (**figur 3.2**).

A)



B)



Figur 3.2: PALME-platen (A) og et detaljbilde av brønnene med PVDF-filteret (B)

En film eller et topplokk ble lagt over akseptorplaten for å holde systemet tett og for å unngå fordamping av akseptorløsningen. Det ferdige ekstraksjonsoppsettet ble satt på en ristemaskin som ristet med en hastighet på 900 rpm i 45 minutter. Ekstraktene ble umiddelbart etter ekstraksjonen overført fra akseptorplaten til prøveglass. Det var viktig at akseptorløsningen ble skilt fra donorløsningen, for å stoppe eventuell videre ekstraksjon. Dersom man antar at ekstraksjonsutbyttet er 100 % vil ekstraksjonen gi en fem ganger oppkonsentrering.

Det ble testet flere ulike donorløsninger, væskemembraner og akseptorløsninger, se **avsnitt 3.7**.

3.6.2 PALME fra fullblod

Fullblodprøver ble laget ved å fortynne standarder og kontroller i blod slik som beskrevet i **avsnitt 3.4.3**. Donorbrønningen ble tilsatt 20 μl fullblodsprøver, 20 μl internstandard og 185 μl donorløsning. På akseptorplaten ble det tilsatt 4 μl organisk væskemembran på PVDF-filteret, og i brønnene ble det tilsatt 150 μl akseptorløsning. Platene ble klemt sammen, forseglet og satt på risting i 60 minutter. Etter ekstraksjon ble 100 μl akseptorløsning overført til

prøveglass eller til en 96-brønnsplate med spisse bunner. Ekstraktene ble fortynnet med 100 µl Milli-Q-vann.

3.6.3 PALME ved validering og reelle prøver

Fullblodprøver ble laget ved å fortynne standarder og kontroller i blod slik som beskrevet i **avsnitt 3.4.3**. Deretter ble VAMS dyppet i rør med fullblodsprøver, slik at «prøvesvampen» absorberte 20 µl blod. VAMS ble tørket i minimum to timer i romtemperatur, før de ble overført ved hjelp av en pinsett til donorbrønn med donorløsning og internstandard. Etter ekstraksjon ble 60 µl ekstrakt overført fra akseptorplaten til prøveglass eller til en 96-brønnsplate med spisse bunner. Ekstraktene ble fortynnet med 40 µl Milli-Q-vann.

Tabell 3.19: Ekstraksjonsparametere for PALME ved validering og reelle prøver.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	VAMS med fullblodsprøver 200 mM Karbonatbuffer (pH=9,3) Internstandard	20 µl 185 µl 20 µl
Akseptorløsning	DMSO: 200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	100 µl
Organisk væskemembran	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA (w/w/w)	4 µl
Ekstraksjonstid	60 min	

3.7 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger

Innledende forsøk på vandige prøveløsninger ble utført på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, UiO. Forsøkene inkluderte seks rusmidler; THC, amfetamin, MDMA, buprenorfin, kodein og morfin. Flere akseptorløsninger, donorløsninger og organiske væskemembraner ble testet. Målet var å finne de kjemiske betingelsene som ekstraherer de seks rusmidlene med best prosesseffektivitet og presisjon fra vandige prøveløsninger.

Organisk væskemembran

Basert på tidligere erfaring ble syv ulike væskemembraner testet. Tidligere erfaring viser at 1 % trioktylamin (TOA), kan maskere eventuell uspesifikk binding av analyttene til PVDF membranen [27].

Tabell 3.20: Test av væskemembraner.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	Standard i 10 mM NaOH	250 µl
Akseptorløsning	20 mM HCOOH	50 µl
Organisk væskemembran	<ul style="list-style-type: none"> • DEHPi + 1 % TOA (w/w) • Undecanon + 1 % TOA (w/w) • Dodecylacetat + 1 % TOA(w/w) • Dihexyleter + 1 % TOA (w/w) • Undecanol + 1 % TOA (w/w) • Isopentylbenzen + 1 % TOA (w/w) • Heksadekan + 1 % TOA (w/w) 	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

I et forsøk med henholdsvis NaOH og fosfatbuffer i donorløsningen, ble de tre væskemembranene som hadde gitt best resultat testet med 15 % Dietylhexylfosfat (DEHP) tilsatt i væskemembranen. I tillegg var det ønskelig å teste isopentylbenzen uten DEHP på nytt. Undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA (w/w/w) ble testet basert på erfaringer fra tidligere studier [42].

Tabell 3.21: De tre væskemembranene som gav høyest prosesseffektivitet (med tilsatt DEHP), isopentylbenzen som væskemembran uten tilsatt DEHP og en kombinasjon av to organiske løsemidler i en væskemembran, som tidligere hadde gitt gode resultat.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	<ul style="list-style-type: none"> • Standard i 10 mM NaOH • Standard i 25 mM Fosfatbuffer (pH=7,47) 	250 µl
Akseptorløsning	DMSO: 200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	50 µl
Organisk væskemembran	<ul style="list-style-type: none"> • Isopentylbenzen + 15 % DEHP +1 % TOA(w/w/w) • Dodecylacetat + 15 % DEHP + 1 % TOA(w/w/w) • Undecanon + 15 % DEHP + 1 % TOA(w/w/w) • Isopentylbenzen + 1 % TOA(w/w) • Undecanon:dihexyleter 1:1+ 1 % TOA (w/w/w) 	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

I et forsøk ble det undersøkt hvor mye DEHP som skal til for å ekstrahere morfin. I forsøket ble 10 mM NaOH benyttet som donorfase og DMSO: 200 mM HCOOH (v/v) som

akseptorløsning. Væskemembranen som inneholdt undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA (w/w/w) uten tilsatt DEHP, ble sammenlignet med tilsats av 5 % og 15 % DEHP.

Donorløsning

I et forsøk ble undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA (w/w/w) testet med og uten DEHP, og ekstrahert med tre buffere som gav ulik pH i prøveløsningen. Se betingelsene for ekstraksjonen i **tabell 3.22**.

Tabell 3.22: Test av ulik pH i prøveløsningen.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	<ul style="list-style-type: none"> Standard i 10 mM NaOH Standard i 25 mM Fosfatbuffer (pH=7,47) Standard i 100 mM Ammoniumkarbonatbuffer (pH=10,2) 	250 µl
Akseptorløsning	100 mM HCOOH	50 µl
Organisk væskemembran	<ul style="list-style-type: none"> Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA (w/w/w) Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA + 15 % DEHP (w/w/w/w) 	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

Akseptorløsning

Basert på tidligere erfaring ble de første forsøkene gjort med 20 mM HCOOH (maursyre) som akseptorløsning. Maursyre som akseptorløsning ble sammenlignet med eddiksyre og trifluor-eddiksyre, for å undersøke hvordan pH i akseptorløsningen påvirket ekstraksjonsutbyttet. Akseptorløsningene som ble testet ut er oppsummert i **tabell 3.23**.

Tabell 3.23: Test av akseptorløsninger med ulik pH:

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	Standard i 25 mM Fosfatbuffer (pH= 7,47)	250 µl
Akseptorløsning	<ul style="list-style-type: none"> 150 mM HCOOH (pH= 2- 2,5) 150 mM CH₃COOH (pH= 3) 150 mM CF₃COOH (pH= 1) 	50 µl
Organisk væskemembran	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP + 1 % TOA (w/w/w/w)	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

Maursyre ble beholdt som akseptorløsning. Det var tidligere vist at DMSO gir økt utbytte for benzodiazepiner [42] og ettersom målet på sikt var å inkludere benzodiazepiner i metoden, ble

mengde DMSO i akseptorløsningen testet ut sammen med forskjellige konsentrasjoner av maursyre. Betingelsene for ekstraksjonen er oppsummert i **tabell 3.24**.

Tabell 3.24: Ulik mengde maursyre og DMSO i akseptorløsningen.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	Standard i 10 mM NaOH	250 µl
Akseptorløsning	• 20 mM HCOOH (pH=3)	50 µl
	• 100 mM HCOOH (pH=2,5)	
	• 200 mM HCOOH (pH=2)	100 µl
	• DMSO:100 mM HCOOH 25:75 (v/v)	
	• DMSO:100 mM HCOOH 50:50 (v/v)	
• DMSO:100 mM HCOOH 75:25 (v/v)		
Organisk væskemembran	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP + 1 % TOA (w/w/w/w)	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

3.8 Optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver

Etter endt optimaliseringsperiode for ekstraksjon av morfin, kodein, MDMA, amfetamin, buprenorfin og THC i vandige betingelser på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo, ble følgende parametere bestemt:

Tabell 3.25: Ferdig optimaliserte ekstraksjonsparametere for vandige prøveløsninger.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	10 mM NaOH	250 µl
Akseptorløsning	200mM HCOOH (pH=2)	50 µl
Organisk væskemembran	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP+ 1 % TOA (w/w/w/w)	3 µl
Ekstraksjonstid	45 min	

Videre optimalisering av ekstraksjonsparametere ble utført i fullblod, ved Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS. Ekstraksjonstiden ble forlenget fra 45 til 60 minutter, mengde akseptorløsning ble økt fra 50/100 til 150 µl, mengde væskemembran ble økt fra 3 til 4 µl og donorløsning ble redusert fra 250 til 225 µl.

Videre forsøk tok sikte på å undersøke hvordan analyttene ble ekstrahert fra blodprøver sammenlignet med vandige prøver. På grunn av problemer med at platene i PALME-oppsettet en periode ikke passet sammen, var forsøkene preget av mye overdrag. Resultatene fra forsøkene kunne dermed ikke brukes til å si noe fornuftig om forskjellen for ekstraksjon av blodprøver i forhold til vandige prøver. Problemet med overdrag ble løst ved å kjøpe nye topplater, som passet sammen med bunnplatene.

Det ble inkludert 14 nye analytter i metoden, hvorav ni var benzodiazepiner. De beste betingelsene for benzodiazepiner i PALME og betingelser for noen basisk upolare analytter (kokain, metamfetamin og metadon), ble bestemt i en masteroppgave fra Farmasøytisk institutt, UiO og Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS i 2017 [42]. I **tabell 3.26** er betingelsene som ble bestemt i masteroppgaven [42] oppsummert, sammen med resultatet av den innledende optimaliseringen i vandige prøver i denne oppgaven. Målet videre var å utarbeide et ekstraksjonsoppsett som ekstraherer de totalt 20 analyttene med tilfredsstillende ekstraksjonsutbytte. Det ble tatt utgangspunkt i betingelsene presentert i tabellen under.

Tabell 3.26: Beste ekstraksjonsbetingelser for benzodiazepiner, basisk upolare analytter og analyttene optimalisert innledningsvis.

Analytter	Donorløsning	Organisk væskemembran	Akseptorløsning
Benzodiazepiner	50 mM Fosfatbuffer	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA (w/w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 75:25 (v/v)
Basisk upolare analytter (eks. kokain, metamfetamin, metadon)	10mM NaOH	Dodecylacetat med 1 % TOA (w/w)	20 mM HCOOH
THC, Amfetamin, MDMA, Buprenorfin, kodein og morfin	10 mM NaOH	Undecanon:dihexyleter (1:1) + 15 % DEHP+ 1 % TOA (w/w/w/w)	200mM HCOOH

Det ble satt opp et forsøk med 27 ulike betingelser (se **vedlegg 1**). For hver betingelse ble det ekstrahert tre paralleller av standard 3. Det ble undersøkt hvilke kombinasjoner av organisk væskemembran, akseptorløsning og prøveløsning som kunne gi god nok respons for de 20 analyttene. Donorløsning, væskemembran og akseptorløsning som ble kombinert er presentert i **tabell 3.27**. Hvordan PALME utføres for prøver i fullblod ved optimaliseringen er beskrevet i **avsnitt 3.6.2**.

Tabell 3.27: Donorløsning, væskemembran og akseptorløsning som ble kombinert til 27 ulike betingelser.

Donorløsning	Organisk væskemembran	Akseptorløsning
50 mM Fosfatbuffer	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA (w/w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 75:25 (v/v)
80 mM NaOH	Dodecylacetat med 1 % TOA (w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 50:50 (v/v)
200 mM Karbonatbuffer	Undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP+ 1 % TOA (w/w/w/w)	200mM HCOOH

Tre betingelser som gav høyest signal for analyttene ble plukket ut. Alle hadde karbonatbuffer som prøveløsning. Det som varierer for betingelsene som gav høyest signal, er mengde DMSO i akseptorløsning, og mengde DEHP i den organiske væskemembranen.

En ny ekstraksjon ble gjort hvor karbonatbuffer som prøveløsning ble holdt konstant. Det ble testet kombinasjoner av ulik mengde DMSO i akseptorløsning og DEHP i organisk væskemembran. Hvilke akseptorløsninger og væskemembraner som ble testet er oppsummert i **tabell 3.28**. Kombinasjon av betingelser er illustrert i **figur 4.9**.

Tabell 3.28: Organisk væskemembran og akseptorløsning med ulik mengde DEHP og DMSO.

Organisk væskemembran	Akseptorløsning
Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA (w/w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 50:50 (v/v)
Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA + 10 % DEHP (w/w/w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 60:40 (v/v)
Undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA + 15 % DEHP (w/w/w/w)	DMSO: 200 mM HCOOH 75:25 (v/v)

Akseptorløsningen og væskemembranen som ble utvalgt basert på dette forsøket, ble ekstrahert med tre ulike donorløsninger. Dette ble gjort for å undersøke betydningen av pH i prøveløsningen.

Tabell 3.29: Ulike donorløsninger.

Donorløsning
50 mM Fosfatbuffer (pH=7,5)
40 mM NaOH
200 mM Karbonatbuffer (pH=9,3)

Fortynning

Ekstrakter som har DMSO i akseptorløsningen, må fortynnes før de kan injiseres i analyseinstrumentet, fordi mye organisk løsemiddel gir brede topper, og dårlig separasjon [42]. Før validering ble det undersøkt hvor mye akseptorløsning, og hvilke forhold ved fortynning av akseptorløsning som er optimale. Laveste standard og kontroll gav lav respons for noen av analyttene, og det er dermed ideelt å unngå for mye fortynning. Det ble gjort et forsøk hvor det ble variert mengde væske i akseptorbrønn, mengde tatt ut av akseptorbrønn etter ekstraksjon og mengde vann tilsatt ekstraktet. Det ble gjort en ekstraksjon med betingelsene i **tabell 3.19**, hvor mengde akseptorløsning varierer mellom 100 og 150 μl . Opprinnelig blir det tilsatt 150 μl akseptorløsning til akseptorbrønnene, og tatt ut 100 μl akseptorløsning etter ekstraksjon, som ble fortynnet 50:50 (v/v) med Milli-Q-vann. Det ble undersøkt om det er mulig å ta ut 60 μl fra akseptorbrønner med 100 μl med 96-kanalpipette. Ekstraktene ble fortynnet 50:50 (v/v) og 60:40 (v/v) med Milli-Q-vann.

3.8.1 Volumetric Absorptive Microsampling

Betingelsene som ble funnet å ekstrahere de 18 rusmidlene i metoden med høyest respons, ble testet for prøvetaking med VAMS. Det ble applisert blod tilsatt rusmidler i tre ulike konsentrasjoner (**tabell 3.8**) på «prøvesvampen», som absorberer 20 μl av blodet. «Prøvesvampen» som sitter på enden av en plastikkpinne (se **figur 2.2 A**), ble puttet ned i et rør med blodprøve. I henhold til anbefaling fra produsenten er det viktig at man ikke putter hele enden ned i blodet, men at man holder pinnen litt på skrå slik at den kommer i kontakt med blodet i røret [43]. Pinnen ble holdt i blodprøven til den var rød, og deretter to sekunder til før den ble fjernet fra blodet. «Prøvesvampene» med fullblodsprøve ble tørket i minimum to timer før de ble ekstrahert med PALME. VAMS ble tilsatt i PALME med betingelsene oppgitt i **tabell 3.30**. Standardkurver basert på ekstraherte VAMS med lineær kurvetilpasning og vekting $1/x$ ble vurdert basert på R^2 og prosesseffektiviteten for VAMS som prøvetakingsmetode ble sammenliknet med blodprøver pipetert direkte i PALME-platen.

Tabell 3.30: Betingelser ved ekstraksjon av VAMS i PALME-oppsett.

	Betingelser	Volum
Prøveløsning	200 mM Karbonatbuffer (pH=9,3) VAMS med fullblodsprøver Internstandard	185 µl 20 µl 20 µl
Akseptorløsning	DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v)	150 µl
Organisk væskemembran	Undecanon:dihexyleter 1:1+ 1 % TOA (w/w/w)	4 µl
Ekstraksjonstid	60 min	

3.9 Metodevalidering

Metoden ble validert i henhold til interne retningslinjer for validering på Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS. Følgende parametere ble inkludert i valideringen: linearitet, nøyaktighet og presisjon, minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), minste detekterbare konsentrasjon (MDK), ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, spesifisitet og overdrag. Valideringen ble utført på VAMS og ekstraksjonsbetingelsene som ble brukt beskrives i **avsnitt 3.6.3**. Konsentrasjon av standardene og kontrollene som ble brukt i valideringen er oppgitt i **tabell 3.11** og **3.12**.

3.9.1 Linearitet

Kjente konsentrasjoner av analytt ble tilsatt fullblod. Det ble gjort en ekstraksjon av fire paralleller fra hver konsentrasjon på ti konsentrasjonsnivå, fra 0,2 ng/ml til 500 ng/ml.

3.9.2 Nøyaktighet og presisjon

Nøyaktighet og presisjon for innen serie (reperbarhet) og mellom serie ble bestemt for fire ulike konsentrasjonsnivå. Repeterbarheten ble vurdert ved å ekstrahere åtte paralleller.

Mellom-serie-variasjon ble vurdert ved å ekstrahere over flere dager. Noen av dagene ble det ekstrahert to sett av standarder og kontroller. Et sett ble satt på samme dag som ekstraksjonen ble gjort og det andre ble satt på dagen etter. På denne måten kan man se på variasjoner mellom ekstraksjoner, samt variasjoner i analyseinstrumentet. Til sammen ble det ekstrahert

og analysert ni sett av standarder og kontroller. Presisjon ble angitt som RSD og nøyaktighet som prosentavvik fra teoretisk verdi [44].

3.9.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon

Det ble undersøkt om kontroll 1 oppfylte krav for minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), hvor nøyaktigheten og presisjonen oppfylte kravene på henholdsvis relativ feil ± 20 % og RSD verdi ≤ 20 %.

3.9.4 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK)

For å beregne minste detekterbare grense, ble standard 1 fortynnet fem, ti, 20 og 100 ganger. Fortynningene ble tilsatt fullblod på samme måte som for standarder og kontroller, og ekstrahert. Konsentrasjonsnivåene er oppgitt i **tabell 3.13**. Det ble ekstrahert tre paralleller. MDK ble beregnet ved signal/støy-forhold på minst 3.

3.9.5 Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet

Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbyttet ble undersøkt for to konsentrasjonsnivå, kontroll 2 og kontroll 4. For hvert konsentrasjonsnivå ble det tilsatt analytt før ekstraksjon (seks paralleller), og etter ekstraksjon av blankt fullblod (seks paralleller). Internstandard ble tilsatt etter ekstraksjon. Ekstraksjonsutbyttet ble beregnet ved å sammenligne signalet fra ekstraktet og blankt blod tilsatt analytt etter ekstraksjon. Analytt tilsatt etter ekstraksjon tilsettes i samme konsentrasjon som ekstraktet skal ha teoretisk, dersom man forutsetter 100 % utbytte. Ved utregning ble det korrigert mot internstandard. Utregning av ekstraksjonsutbytte er vist i **ligning 7**.

Prosesseffektivitet

Prosesseffektivitet blir utregnet ved å sammenligne signalet fra ekstraktet med en standard tillaget i mobilfase i den konsentrasjonen som tilsvarer 100 % utbytte ved ekstraksjon. Prosesseffektivitet ble brukt som parameter istedenfor ekstraksjonsutbytte ved innledende forsøk og optimalisering. Utregning av prosesseffektivitet er vist i **ligning 8**.

3.9.6 Matrikseffekter

Matrikseffekt ble undersøkt ved å benytte Matuszewskis metode [45]. I metoden ble responsen fra blankt blod tilsatt analytt etter ekstraksjon, sammenlignet med en standard tillaget i mobilfase i den konsentrasjonen som tilsvarer 100 % utbytte ved ekstraksjon. Ved utregning ble det korrigert mot internstandard.

Matrikseffekt ble undersøkt på to konsentrasjonsnivå, for kontroll 2 og kontroll 4.

A: Analyttene ble ekstrahert fra to sett med seks paralleller blankt blod. Det ble brukt blod fra seks ulike personer. Etter ekstraksjon ble 60 µl akseptorløsning overført i tom brønn på en 96 brønnsplate med spisse bunner. Brønnene ble tilsatt 40 µl vann med analytt, seks paralleller kontroll 2 og seks paralleller kontroll 4. I hver brønn ble det tilsatt 20 µl internstandard. Mengde kontroll 4 og kontroll 2 som ble tilsatt i vannet, skal tilsvare konsentrasjon i akseptorløsning for kontroll ekstrahert på vanlig måte, dersom man regner med 100 % utbytte.

B: To brønner ble tilsatt 40 µl vann med analytt, en ble tilsatt kontroll 2 og den andre kontroll 4. I hver av brønnene ble det tilsatt 20 µl internstandard, og 60 µl løsemiddel som er likt det som blir brukt som akseptorløsning, men som ikke har vært i kontakt med PALME- platen.

Matrikseffekter (ME) ble beregnet med **ligning 9**. Topp høyden av A og B ble brukt. Det ble korrigert mot internstandard.

3.9.7 Selektivitet

Fem blandinger som inneholdt legemidler som antipsykotika, antidepressiver, smertestillende, hjertemedisiner, og en rekke med nye psykoaktive stoffer (1-5, **vedlegg 5**) ble tillaget. Hver av blandningene ble tilsatt fullblod, og i tillegg metodens analytter i en konsentrasjon svarende til kontroll 2. Fra hvert rør ble det tillaget tre paralleller med VAMS som ble tørket over natten.

3.9.8 Overdrag

Overdrag ble undersøkt ved å analysere ekstraherte blanke prøver etter standard 6 og en ekstrahert prøve med en konsentrasjon tre ganger høyere enn standard 6. For å undersøke om det er noe overdrag i systemet, ble det utregnet hvor mange prosent signalet til den blanke prøven som er kjørt etter standard 6/høy standard, er i forhold til den laveste standarden (standard 1). I henhold til EMAs retningslinjer har man overdrag i systemet dersom signalet er 20 % eller høyere av signalet til den laveste standarden [44].

3.10 Ekstraksjon av reelle prøver

Ved Avdeling for rettsmedisinske fag, ble det i 2016-2017 utført en veikant-undersøkelse på Østlandet for å følge utviklingen av rusmiddelbruk i trafikken [46]. Blodprøvene ble tatt ved et lite stikk i fingeren med lansett, og blodet ble samlet opp med VAMS. De tørkede blodprøvene ble oppbevart i romtemperatur.

Ekstraksjon av reelle prøver beskrives i **avsnitt 3.6.3**. Betingelsene for ekstraksjonen oppgis i **tabell 3.19**.

3.11 Beregninger og formler

3.11.1 Ekstraksjonsutbytte

Ligning 7 [45]: Ekstraksjonsutbytte (%) = $\frac{C}{B} \times 100$

, der C er respons av analytt i ekstrakt og B er respons av analytt tilsatt etter ekstraksjon.

3.11.2 Prosesseffektivitet

Ligning 8 [45]: Prosesseffektivitet (PE) (%) = $\frac{C}{A} \times 100$

, der C er respons av analytt i ekstrakt og A er respons av analytt tilsatt i ren løsning.

3.11.3 Matrikseffekter

Ligning 9 [45]: Matrikseffekt (ME) (%) = $\frac{A}{B} \times 100$

, der A er respons av analytt tilsatt i ren løsning og B er respons av analytt tilsatt etter ekstraksjon.

3.11.4 Nøyaktighet

Nøyaktighet oppgis som relativ feil:

Ligning 10: Relativ feil (%) = $\frac{(\text{målt} - \text{teoretisk})}{\text{Teoretisk}} \times 100$

3.11.5 Presisjon

Ligning 11[47] $RSD(\%) = \frac{\text{Standardavvik for målingene}}{\text{Gjennomsnitt av målingene}} \times 100$

4 Resultat og diskusjon

Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger ble utført for seks analytter på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, UiO. Betingelser for ekstraksjon, som valg av organisk væskemembran, donorløsning og akseptorløsning ble bestemt. Videre optimalisering ble utført ved Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS. Fjorten analytter ble lagt til i metoden, og optimaliseringen ble utført for fullblodsprøver. Ved ferdig optimaliserte betingelser ble VAMS testet som prøvetakingsmetode, og metoden ble validert.

Separasjon av analytter og komponenter i prøveløsningen i PALME baserer seg som tidligere nevnt på en pH-gradient, som dannes ved å justere pH i prøveløsningen og akseptorløsningen. Analyttene som var inkludert i denne oppgaven bestod av et bredt spekter av legemidler og rusmidler. Samtlige analytter har en basefunksjon (med unntak av THC), og to analytter; buprenorfin og morfin er zwitterioner. Polariteten til analyttene varierte med log P-verdi fra 0,9 for morfin til 5,9 for THC. Studier med PALME som ekstraksjonsmetode er tidligere gjort for sure og basiske analytter, polare analytter og for nye psykoaktive substanser [9, 27, 48, 49]. Analytter som er zwitterioner har tidligere vært vanskelige å ekstrahere med PALME.

Prøveopparbeidelsen medfører en viss fare for tap av analytt. Det er ved utvikling av en ny ekstraksjonsmetode relevant å bestemme ekstraksjonsutbyttet for å gi et svar på om analytt tapes under ekstraksjonen [21]. Ved innledende forsøk blir prosesseffektiviteten (**ligning 8**) beregnet istedenfor ekstraksjonsutbytte (**ligning 7**).

4.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger

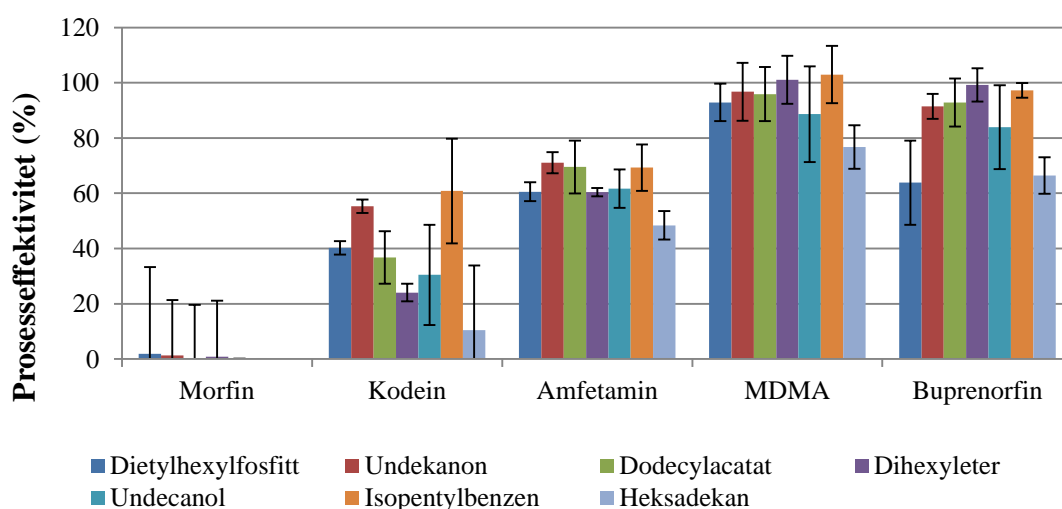
Det er tidligere utført analyser av diverse rusmidler og legemidler med PALME [37-40], men viktige legemidler som morfin og kodein, samt rusmidler som THC, amfetamin og MDMA (ecstasy) er ikke tidligere ekstrahert med denne teknikken. Innledningsvis ble det derfor forsøkt utviklet en metode for PALME av THC, amfetamin, MDMA, buprenorfin, kodein og morfin fra vandige prøver. Formålet var å undersøke hvilke kjemiske betingelser som gav en mest mulig effektiv ekstraksjon med høy prosesseffektivitet og presisjon. Virkestoffet i cannabis, THC er det nest mest påviste rusmidlet hos bilførere etter alkohol [46], og en

metode som inkluderte rusmidlet var sterkt ønsket. THC som er svært upolart og ikke har noen basefunksjon var selv i høye konsentrasjoner ved de innledende forsøkene ikke mulig å ekstrahere med PALME, og måtte dermed ekskluderes fra metoden

Organisk væskemembran

Syv væskemembraner ble testet basert på tidligere erfaring. Fire av væskemembranene har tidligere blitt brukt i ekstraksjon med PALME [27]. Bis(2-etylhexyl) phosphite (DEHPi) har tidligere blitt brukt som væskemembran i EME [50], og ble i denne studien for første gang undersøkt som væskemembran i PALME. Undecanol har tidligere blitt brukt som væskemembran i HF-LPME [51]. Det er viktig at de organiske løsemidlene som brukes i væskemembranen ikke er flyktige eller blandbare med vann, for å hindre fordamping av løsemidlet og at membranen skal lekke til de vandige akseptor- og donor-løsningene under ekstraksjonen [27].

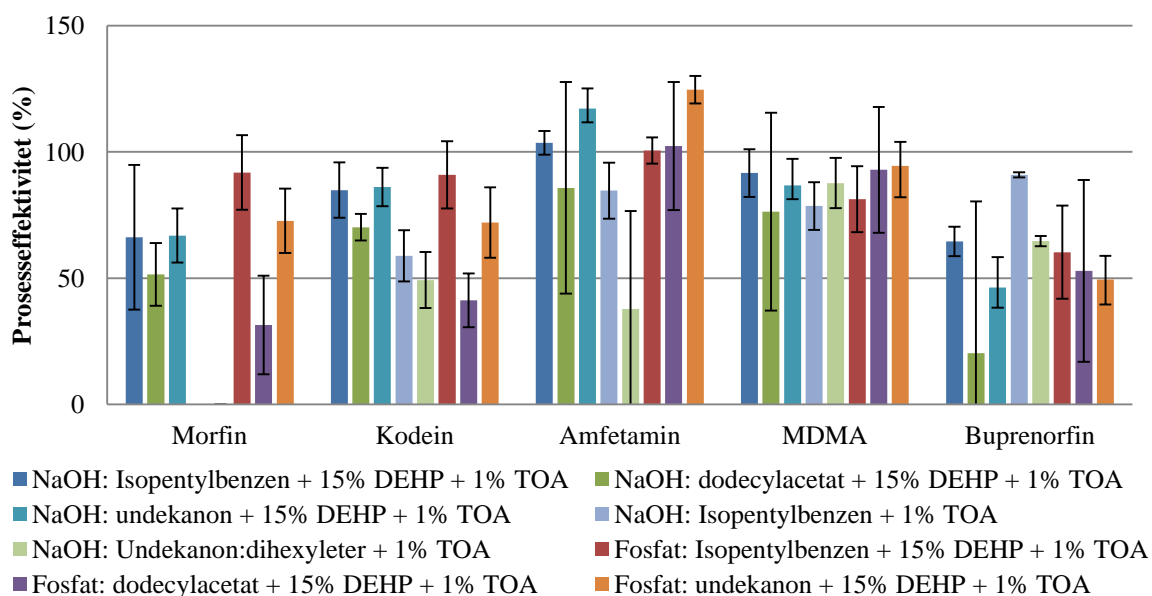
Det ble tilsatt trioktylamin (TOA) til alle væskemembranene i dette forsøket. TOA tilsettes basert på erfaringer fra tidligere studier [27], for å maskere eventuell uspesifikk binding av analyttene til PVDF-membranen. Tilsetning av TOA er testet ut for flere analytter som ekstraheres med PALME, og effekten av tilsetningen har vist seg å være avhengig av analytten som ekstraheres [27]. Resultatet fra forsøket er fremstilt i **figur 4.1**.



Figur 4.1: Prosesseffektivitet for ulike organiske løsemidler med 1 % TOA. Ekstraksjonsbetingelser: 250 μ l prøveløsning (200 ng/ml) tillaget i 10 mM NaOH; 50 μ l 20 mM HCOOH akseptorløsning; 3 μ l væskemembran med 1 % TOA (w/w); Ekstraksjonstid 45 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=4)

Polare analytter som kodein, og også delvis amfetamin og metamfetamin får lav prosesseffektivitet dersom heksadekan brukes som løsemiddel i væskemembranen. Dette er fordi heksadekan er et for hydrofobt løsemiddel for de polare analyttene. Alle væskemembranene ekstraherte morfin med minimalt utbytte. Morfin er et polart stoff med log P-verdi på 0,9, og kan være utfordrende å ekstrahere over den organiske væskemembranen. Det er i tidligere studier forsøkt å tilsette ionepar-reagens som kan danne ionepar med polare analytter, slik at det danner et kompleks som er mer hydrofobt og kan passere over væskemembranen [48]. Dietylhexylfosfat (DEHP) er en slik ionepar-reagens, som kan danne ionepar med de positivt ladete molekylene i grenseflaten mellom væskemembranen og prøven, og fremmer på den måten migrasjon fra prøven til væskemembranen [50]. Det avhenger av analyttenes kjemiske egenskaper og pH i donorfasen om analyttene i prøven kan danne ionepar med DEHP.

De tre væskemembranene som gav høyest prosesseffektivitet, undecanon, dodecylacetat og isopentylbenzen, ble tilsatt 15 % DEHP, og sammenlignet, i et forsøk med henholdsvis fosfatbuffer og NaOH som donorløsning. Isopentylbenzen, som var den av de tre væskemembranene som hadde vist høyest prosesseffektivitet, ble inkludert i forsøket også uten tilsatt DEHP. Undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA ble inkludert i forsøket, basert på erfaring fra tidligere studier [42]. Resultatene fra forsøket er presentert i **figur 4.2**.

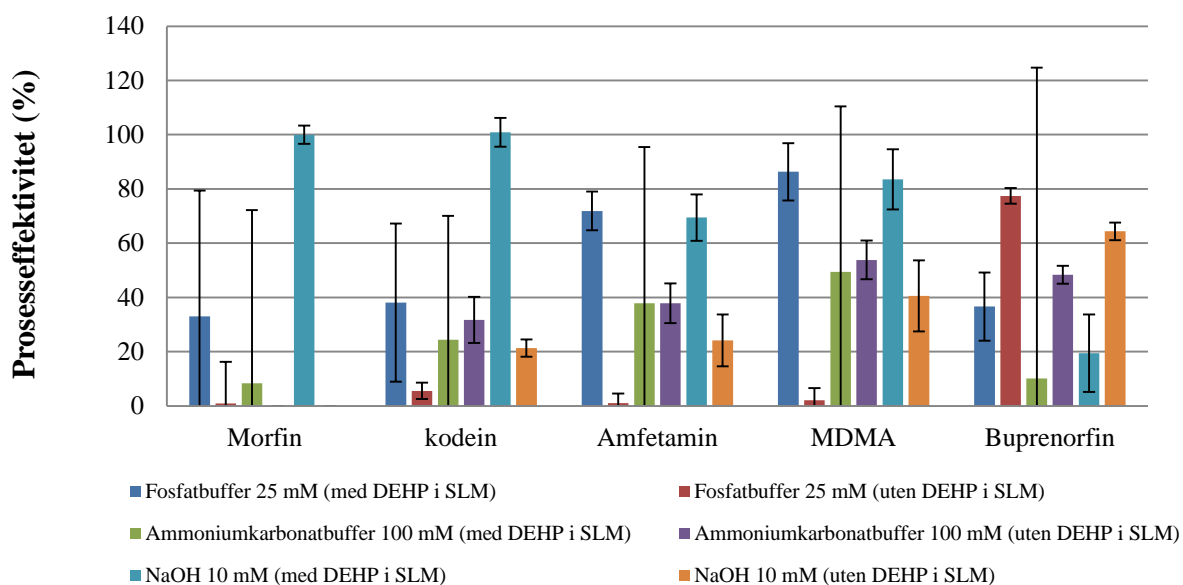


Figur 4.2: Undecanon, isopentylbenzen og dodecylacetat tilsatt 15 % DEHP. Isopentylbenzen og undecanon:dihexyleter 1:1 uten DEHP. Testet med henholdsvis NaOH og fosfatbuffer som donorløsning. Ekstraksjonsbetingelser: 250 µl prøveløsning (200 ng/ml); 50 µl DMSO:200mM HCOOH 75:25 (v/v) akseptorløsning; 3 µl væskemembran (w/w)/(w/w/w); Ekstraksjonstid 45 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=4)

Forsøket viser at væskemembranene som er tilsatt DEHP øker prosesseffektiviteten for morfin fra tilnærmet 0 % til 30-90 %. DEHP i væskemembranen gir høyere prosesseffektivitet for kodein, amfetamin og MDMA som er baser med log P verdier ≤ 2 . For buprenorfin ble prosesseffektiviteten lavere med DEHP i væskemembranen. Et forsøk for å bestemme optimal mengde DEHP i væskemembranen ble utført. Væskemembranen som ble undersøkt ble tilsatt 5 og 15 % DEHP, og sammenlignet med væskemembran uten DEHP. Lavere mengde DEHP enn 15 % hadde ingen relevant effekt for ekstraksjon av morfin.

Prøveløsning

Undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA har man erfaring med ved ekstraksjon av analytter som på sikt skal inkluderes i oppgaven. Det var dermed interessant å undersøke denne væskemembranen ytterligere ved tilsetning av DEHP, og med tre ulike donorløsninger med ulik pH. Resultatet er presentert i **figur 4.3**.



Figur 4.3: Tre ulike donorfaser ble testet i prøveløsningen, med og uten DEHP i væskemembranen. Ekstraksjonsbetingelser: 250 μ l prøveløsning (200 ng/ml); 50 μ l 100mM HCOOH akseptorløsning; 3 μ l væskemembran (SLM) undecanon:dihexyleter 1:1 (w/w) med og uten DEHP; Ekstraksjonstid 45 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=4)

Morfin ble ekstrahert med 100 % utbytte og høy presisjon når ekstraksjonen ble utført med undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA og 15 % DEHP som væskemembran og 10 mM NaOH som donorløsning. Morfin vil ha en negativ netto ladning ved pH 12, og kan dermed ikke inngå i en ionisk interaksjon med DEHP. Det tyder på at andre molekulære interaksjoner kan ha stor betydning, som for eksempel dipol-dipol interaksjon. Dersom fosfatbuffer

(pH=7,5) brukes som donorløsning vil morfin ha positiv netto ladning. Høyt utbytte med DEHP i væskemembranen og fosfatbuffer som donorløsning, kan skyldes en ionisk interaksjon mellom den negativt ladede ionebæreren og positiv ladning på analytten. Resultatet var preget av usikkerhet på grunn av lav presisjon. Forsøket bekrefter at prosesseffektiviteten er tilnærmet 0 % for morfin, uten DEHP i væskemembranen. Kodein ble ekstrahert med høyest prosesseffektivitet, med de samme betingelsene som morfin.

Væskemembran med DEHP gav bedre resultat for amfetamin og MDMA, enn væskemembran uten DEHP. Amfetamin og MDMA har basefunksjon med pKa rundt 10. Analyttene vil dermed være fullstendig ionisert i fosfatbuffer (pH 7,5), mens ioniseringen vil være fullstendig undertrykt i NaOH (pH 12). Det er ut i fra dette forventet at NaOH som prøveløsning bør gi betydelig høyere ekstraksjonsutbytte for amfetamin og MDMA. Når DEHP ikke var tilsatt i væskemembranen stemte teorien om høyere prosesseffektivitet ved høy pH. Fosfatbuffer som prøveløsning gjør at basefunksjonen på amfetamin og MDMA er ionisert. Dette gjør at analyttene løses bedre i vandige betingelser og vil i mindre grad ekstraheres over den organiske væskemembranen. Væskemembran med DEHP gav derimot god prosesseffektivitet med fosfatbuffer som donorløsning. Dette kan skyldes at DEHP virker som en ionebærer som frakter de positivt ladde molekylene over væskemembranen. NaOH som donorfase i kombinasjon med DEHP i væskemembranen gav også god prosesseffektivitet, og kan på samme måte som for morfin skyldes andre molekylære interaksjoner, og ikke en ionisk interaksjon med DEHP.

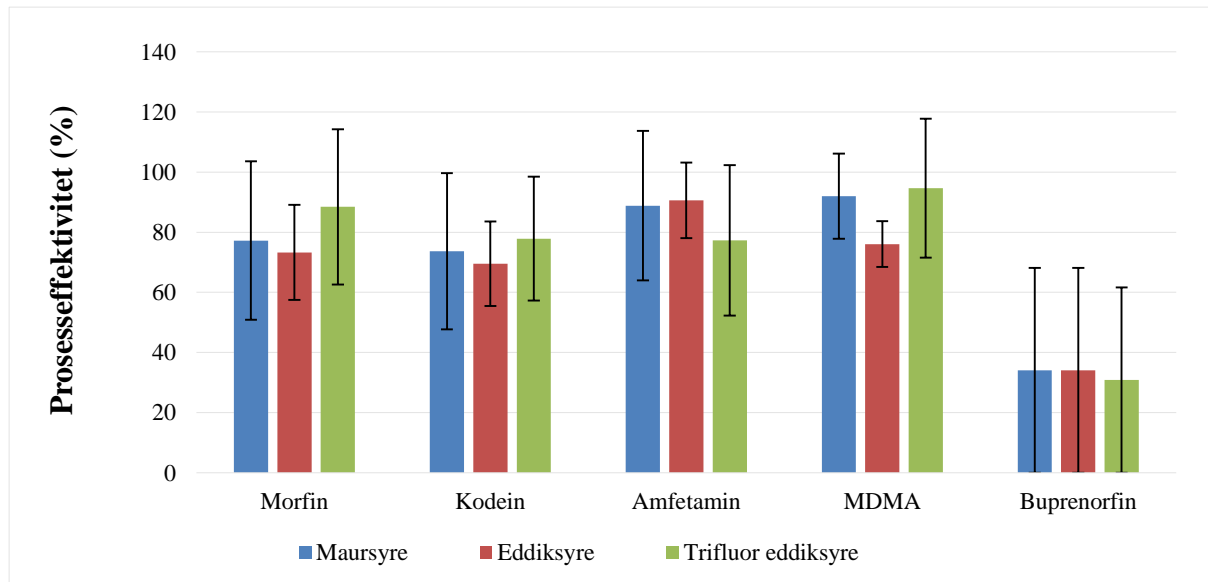
Buprenorfin som er mer upolart enn de andre analyttene, med en log P-verdi på 3,55, ble ekstrahert med høyere prosesseffektivitet uten DEHP i væskemembranen. Buprenorfin er et zwitterion, med en basisk pKa-verdi på 9,6 og en sur pKa- verdi på 10,4. Dette gjør at den er mer eller mindre ladet til en hver tid.

På grunn av høy prosesseffektivitet og god presisjon med undecanon:dihexyleter 1:1 med 1 % TOA og 15 % DEHP som væskemembran og 10 mM NaOH som donorfase, ble det valgt å gå videre med disse betingelsene.

Akseptorløsning

For å oppnå optimal frigjøring av analytt fra væskemembranen til akseptorløsningen ble betydningen av pH-verdien og den kjemiske sammensetningen i akseptorløsningen undersøkt.

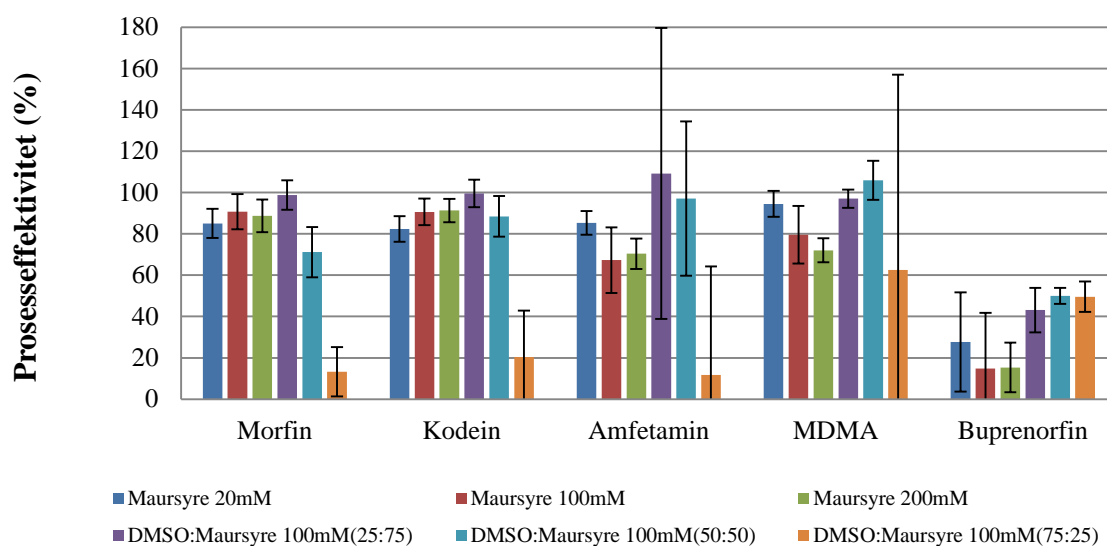
Ved valg av akseptorløsning er det viktig at den er kompatibel med direkte injeksjon i LC-MS/MS [8]. Tre sure løsninger ble testet som akseptorfase; maursyre 150 mM (pH=2–2,5), eddiksyre 150 mM (pH=3) og Trifluoreddiksyre (pH=1). Resultatet er fremstilt i **figur 4.4**.



Figur 4.4: Ulike syrer som akseptorløsning. Ekstraksjonsbetingelser: 250 µl prøveløsning (200 ng/ml) tillaget i 25 mM fosfatbuffer (pH=7,47); 50 µl akseptorløsning (150 mM); 3 µl væskemembran undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP+ 1 % TOA(w/w/w/w); Ekstraksjonstid 45 minutter, ristetthastighet 900 rpm (n=4)

Forsøket viste ingen relevant forskjell i prosesseffektivitet for de seks analyttene. Det ble dermed valgt å gå videre med maursyre som akseptorløsning på grunnlag av mer erfaring med maursyre som akseptorløsning ved tidligere studier [8, 27, 52, 53].

Ved tidligere forsøk ble det vist at DMSO gav økt utbytte for benzodiazepiner [42]. Ettersom målet var å etterhvert inkludere benzodiazepiner i metoden, var det ønskelig å undersøke hvordan DMSO påvirket prosesseffektiviteten for rusmidlene. Det ble gjort et forsøk hvor det ble undersøkt hvilken styrke maursyre og mengde DMSO som gav best prosesseffektivitet. DMSO er et organisk løsemiddel, og tilsetning av løsemidlet til akseptorløsningen vil gjøre den mindre polar. Dersom man ser økt prosesseffektivitet i forhold til ren maursyre kan det komme av økt løselighet av analyttene i mer upolar akseptorløsning. Høyere konsentrasjon maursyre kan bidra til å skyve likevekten av analyttene mot protonert form i akseptorløsningen, og kan på den måten øke løseligheten til analyttene i akseptorløsningen, og dermed også prosesseffektiviteten.



Figur 4.5: Økende konsentrasjon maursyre og større mengde DMSO i akseptorløsningen. Ekstraksjonsbetingelser: 250 μ l prøveløsning (200 ng/ml) tillaget i 10 mM NaOH; 50 μ l /100 μ l (maursyre/ DMSO:maursyre (v/v)) akseptorløsning; 3 μ l væskemembran undecanon:dihexyleter 1:1 + 15 % DEHP+ 1 % TOA (w/w/w/w); Ekstraksjonstid 45 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=4)

Resultatene viser at de polare analyttene (med lav log P-verdi), blir ekstrahert med lav prosesseffektivitet spesielt ved høye mengder DMSO. Buprenorfin, som er en mer upolar analytt ekstraheres med høyere prosesseffektivitet ved økende mengde DMSO. Valg av akseptorløsning ble tatt som et kompromiss mellom høyt utbytte og lavere RSD verdier, og på bakgrunn av dette ble det valgt å gå videre med 200 mM maursyre.

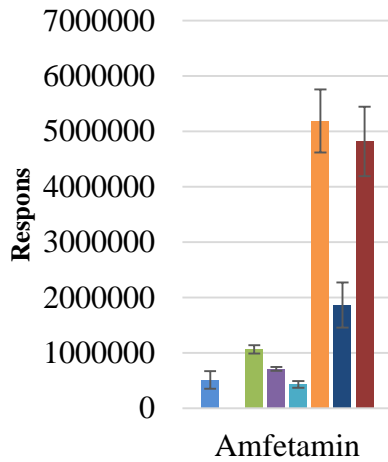
Basert på tidligere erfaring [42] ble ekstraktet fortynnet 1:1 (v/v) med Milli-Q-Vann når DMSO var tilsatt i akseptorløsningen. Høy mengde organisk løsemiddel kan føre til mindre retensjon av analyttene på den hydrofobe stasjonærfasen i kolonnen, og det var ved tidligere forsøk sett at å injisere så mye organisk løsemiddel i LC-MS instrumentet førte til brede topper, og dårlig separasjon [42].

4.2 Optimalisering av ekstraksjonsparametere for fullblodsprøver

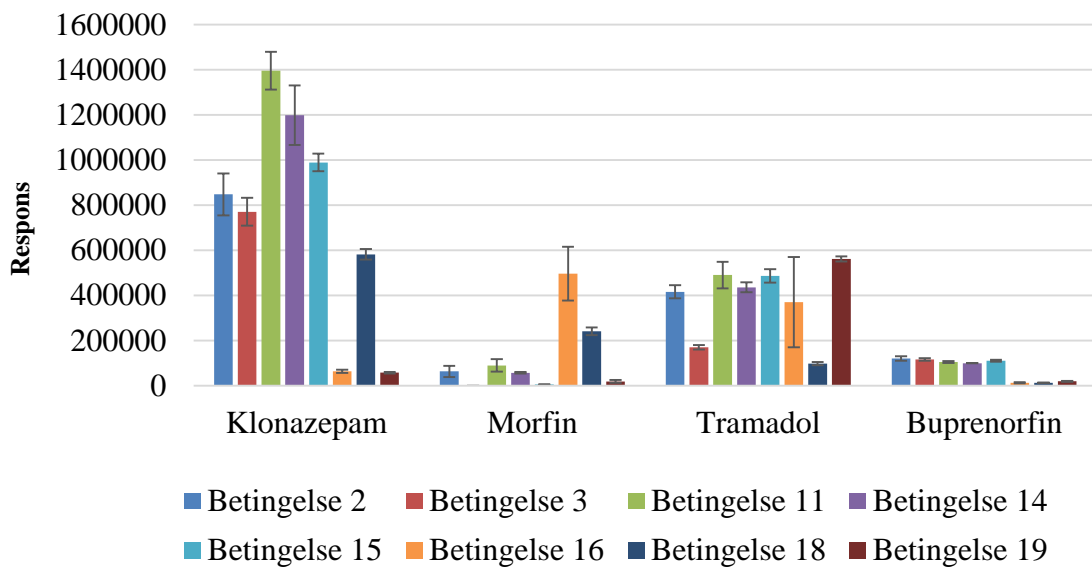
Etter endt optimalisering på vandige prøver ble det inkludert 14 nye analytter i metoden, hvor ni av analyttene var benzodiazepiner. De totalt 20 analyttene var rusmidler fra ulike legemiddelklasser, og lignet ikke på hverandre strukturelt. Målet var å undersøke ved hvilken betingelse analyttene ble ekstrahert med god nok prosesseffektivitet og samtidig RSD-verdier innenfor gjeldende kriterier for presisjon. Ved overgangen fra ekstraksjon av vandige prøveløsninger til fullblodsprøver ble diverse parametere endret. Mengde donorløsning i donorbrønnen ble redusert fra 250 til 225 μl , og mengde akseptorløsning ble økt fra 50–100 μl til 150 μl . 100 μl ble tatt ut av akseptorbrønnen og fortynnet med 100 μl Milli-Q-vann. Organisk løsemiddel tilsatt på væskemembranen ble økt fra 3 til 4 μl . Dette var fordi 3 μl i noen tilfeller ikke var nok for å fylle hele volumet i filteret. Det er vist i tidligere studier at mengde organisk løsemiddel tilsatt ikke har noen relevant betydning, så lenge det tilsettes tilstrekkelig for å danne væskemembranen [9]. Ekstraksjonstiden ble forlenget fra 45 til 60 minutter. Tiden for ekstraksjon ble forlenget på bakgrunn av forsøk utført på benzodiazepiner i fullblod, hvor de fleste analyttene nærmet seg en likevekt etter ekstraksjon i 60 minutter [42].

Det ble tatt utgangspunkt i betingelser som er undersøkt tidligere, og har vist god respons for mange av analyttene (begrunnelse for valg av betingelser, se **avsnitt 3.8**). Et forsøk ble satt opp hvor det ble inkludert tre buffere, akseptorløsninger og organiske væskemembraner, som til sammen gav 27 ulike betingelser (se **vedlegg 1**). For å illustrere forsøket, viser **figur 4.6** fem analytter og en eller to av de betingelsene som ekstraherte hver analytt med best respons (til sammen åtte betingelser).

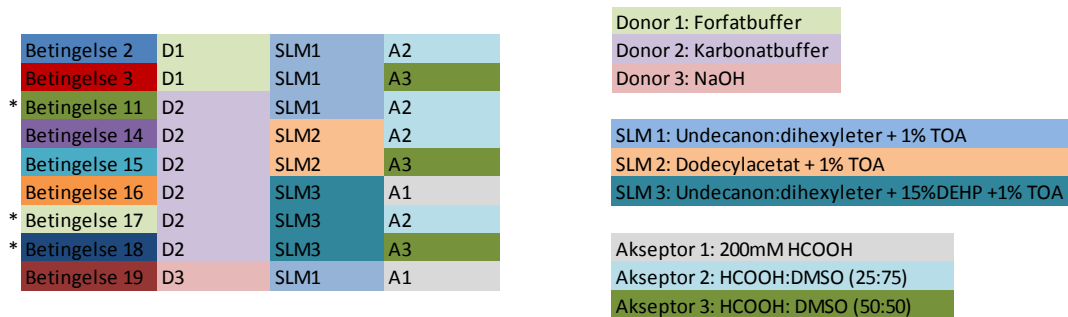
A)



B)



Figur 4.6: Respons for fem utvalgte analytter ved åtte utplukkede betingelser (standard 3). A) Amfetamin (vist i eget diagram på grunn av høyere respons enn resten av analyttene) B) Respons for klonazepam, morfin, tramadol og buprenorfin. Ekstraksjonstid 60 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=3)

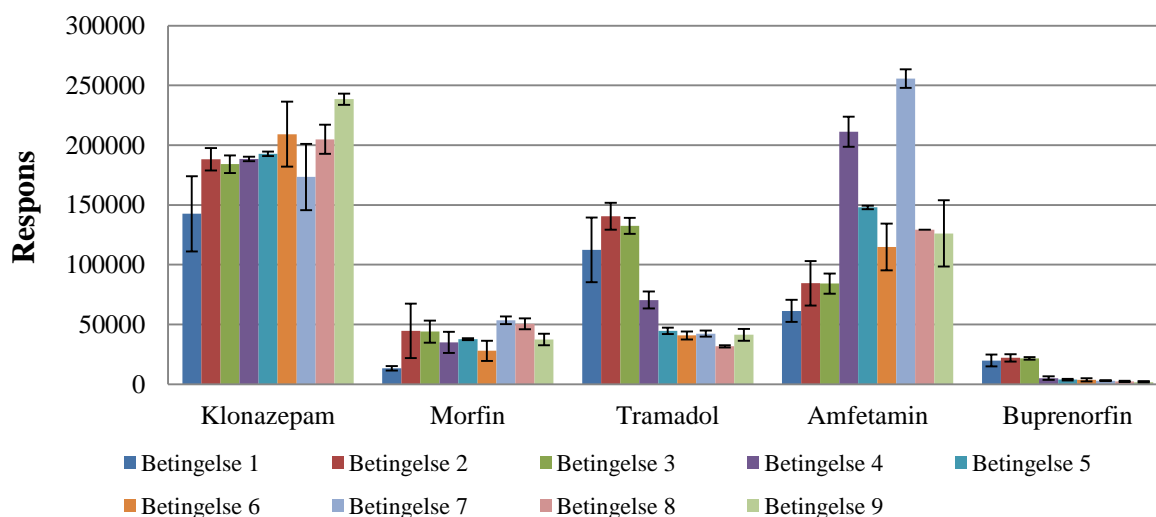


Figur 4.7: Et utvalg av ni betingelser. Betingelser som ekstraherte flest analytter med god respons er markert med *.

Betingelsene for alle analyttene er oppsummert i **vedlegg 1**.

Dette forsøket gav et godt bilde av hvilke betingelser som gav best respons for hver enkelt analytt. Oversikt over respons for hver analytt ved hver betingelse er presentert i **vedlegg 2**. De tre betingelsene som jevnt over ekstraherte de fleste analyttene med høyest respons ble plukket ut (**Figur 4.7**).

Fellesnevneren for de tre betingelsene var at de hadde ammoniumkarbonatbuffer i prøveløsningen. De eneste forskjellene i løsningene som ble brukt som organisk væskemembran og akseptorløsning var henholdsvis mengde DEHP og DMSO. Karbonatbuffer i prøveløsningen ble holdt konstant i videre forsøk. Tre væskemembraner med ulik mengde DEHP, og tre akseptorløsninger med økende mengde DMSO ble testet, i et forsøk som gav ni betingelser. Det er valgt å presentere resultatene for de samme fem analyttene som i forrige forsøk. Resultatet er presentert i **figur 4.8**.



Figur 4.8: Respons for fem utvalgte analytter ved ni ulike betingelser.

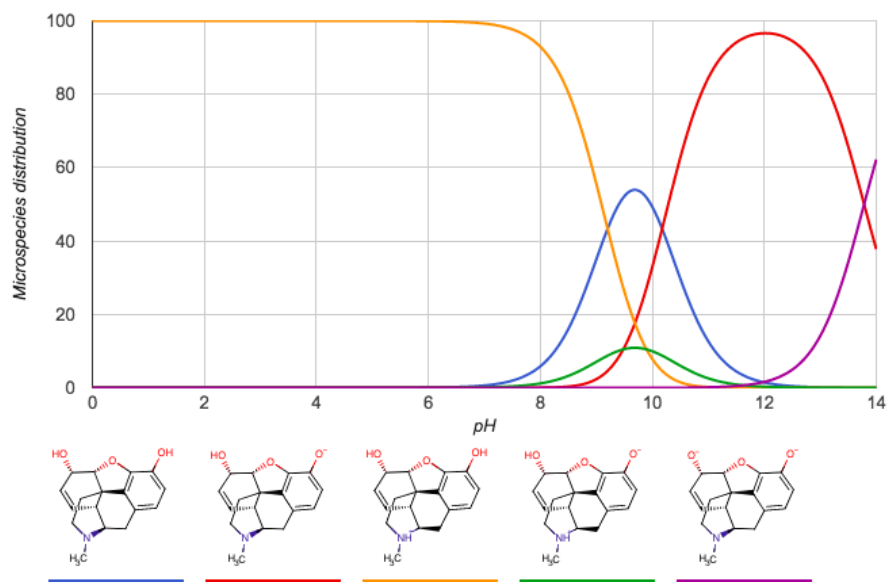
Betingelse 1:	Karbontbuffer	SLM1	A1	SLM 1: Undecanon:dihexyleter + 1% TOA
Betingelse 2:	Karbontbuffer	SLM1	A2	SLM 2: Undecanon:dihexyleter + 10% DEHP + 1% TOA
Betingelse 3:	Karbontbuffer	SLM1	A3	SLM 3: Undecanon:dihexyleter + 15%DEHP +1% TOA
Betingelse 4:	Karbontbuffer	SLM2	A1	Akseptor 1: HCOOH:DMSO (50:50)
Betingelse 5:	Karbontbuffer	SLM2	A2	Akseptor 2: HCOOH:DMSO (40:60)
Betingelse 6:	Karbontbuffer	SLM2	A3	Akseptor 3: HCOOH:DMSO (25:75)
Betingelse 7:	Karbontbuffer	SLM3	A1	
Betingelse 8:	Karbontbuffer	SLM3	A2	
Betingelse 9:	Karbontbuffer	SLM3	A3	

Figur 4.9: Oversikt over hvilke akseptorløsninger og væskemembraner som ble kombinert i hver betingelse.

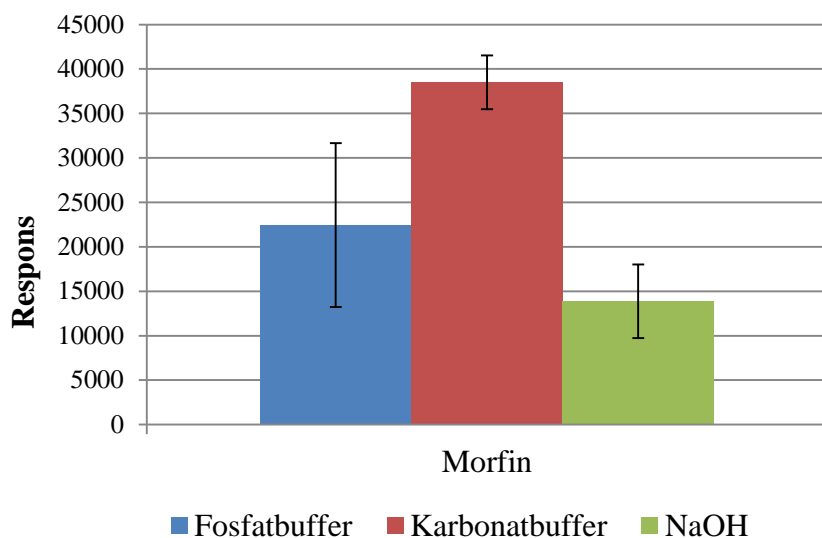
Trender fra forsøkene viste at flere av de mer polare analyttene, som morfin, amfetamin, metamfetamin og MDMA ble ekstrahert med høyere respons dersom DEHP var tilsatt i væskemembranen. Buprenorfin, som er en upolar analytt, ble derimot ekstrahert med lav respons med DEHP tilsatt i væskemembranen. Responsen for tramadol ble lav ved kombinasjonen av DEHP i væskemembranen og DMSO i akseptorløsningen. For amfetamin, metamfetamin og MDMA gav ren maursyre som akseptorløsning betydelig høyere respons enn akseptorløsning med DMSO. DMSO i akseptorløsningen gav, som sett i tidligere studier [42], høyere respons for benzodiazepiner. Amfetamin, metamfetamin og MDMA har pKa verdier rundt 10. Omtrent 15–20 % av analyttene vil være nøytrale med karbonatbuffer (pH 9,3) i donorløsningen. Analyttene vil være fullstendig ioniserte med fosfatbuffer i donorfasen (pH 7,5), og med NaOH (pH 12) i donorløsningen vil all ladning være slukket. NaOH i donorløsningen gav høyest respons for amfetamin, metamfetamin og MDMA. Benzodiazepinene, zopiklon, metadon og buprenorfin ble ekstrahert med lav respons når NaOH ble brukt som donorløsning. Forsøkene viser at det på grunn av forskjeller i både polaritet og pKa er vanskelig å finne en ideell betingelse for ekstraksjon, og at det er nødvendig med et kompromiss når man ønsker en multikomponent metode.

Betingelse 3 fra **figur 4.9** som tilsvarer betingelse 11 i **figur 4.7**, består av akseptorløsningen; DMSO:200 mM HCOOH 75:25, væskemembranen; undecanon:dihexyleter 1:1 + 1 % TOA, og donorløsningen; 200 mM karbonatbuffer. Disse betingelsene utgjør den kombinasjonen som gav høyest respons for flest analytter. Mange av analyttene ble ekstrahert med lavere respons enn hva som var potensielt mulig ved optimale betingelser for hver enkelt analytt.

For å være helt sikker på at karbonatbuffer var den donorfasen som generelt gav høyest respons, ble det utført et forsøk der karbonatbuffer som donorfase ble sammenlignet med fosfatbuffer og NaOH. Væskemembran og akseptorfase ble holdt konstant ved samme betingelser som betingelse 3 (**figur 4.9**)/betingelse 11(**figur 4.7**). Resultatene fra forsøket viste at hvilken donorfase som ble brukt ikke gav veldig store utslag for de fleste analyttene. Karbonatbuffer som donorfase gav jevnt høyere respons, og litt lavere variasjon. Morfin var den analytten som i størst grad ble påvirket av hvilken donorfase som ble valgt. Morfin har et amin med basisk pKa på omtrent 9, og en fenol med sur pKa på omtrent 10. Dette gjør at ladningen på aminet vil være fullstendig slukket ved 10 mM NaOH (pH 12), samtidig vil fenolen ha negativ ladning. Dersom 25 mM fosfatbuffer (pH 7,5) brukes som buffer vil ladningen på fenolen være fullstendig slukket, mens aminet vil ha ladning. Karbonatbufferen har en pH som ligger mellom pKa verdiene til aminet og fenolen (pH 9,3), og begge gruppene vil ha en delvis ladning. **Figur 4.10** viser at omtrent 50 % er i nøytral form når pH i løsningen er 9,3 (blå linje). **Figur 4.11** viser at karbonatbuffer som donorfase gav høyest respons, og lavere variasjon for morfin. Karbonatbuffer ble valgt som donorfase ved endelige optimaliserte betingelser.



Figur 4.10: Illustrasjon over hvilke grupper på molekylet som vil være ladet enhver pH-verdi. Blå linje illustrerer nøytral form. hentet fra [41]



Figur 4.11: Respons for morfin med fosfatbuffer, karbonatbuffer og NaOH i donorfasen. Ekstraksjonsbetingelser: Donorbrønn (250 µl) med 20 µl fullblodsprøver, 20 µl internstandard og 185 µl donorløsning; 150 µl DMSO:200 mM HCOOH 75:25 (v/v) akseptorløsning; 4 µl væskemembran undecanon:dihexyleter 1:1+ 1 % TOA (w/w/w); Ekstraksjonstid 60 minutter, ristehastighet 900 rpm (n=4)

Fortynning

En 96-kanalspipette tilgjengelig fra Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS, gjorde det mulig å utforske hvordan ekstraksjonen kunne utføres mest mulig tidseffektivt, og med utstyr som på sikt kan automatiseres. Forsøkene ble først gjort med 150 µl akseptorløsning, hvor 100 µl ekstrakt ble tatt ut etter ekstraksjonen, og fortynnet med 100 µl Milli-Q-vann. Forholdene er valgt ut fra tidligere studier [42], og er de forholdene som ble benyttet for alle forsøkene frem til valideringen. På grunn av lav respons ved laveste standard for enkelte analytter, var det ønsket å oppkonsentrere mer under ekstraksjonen og fortynne ekstraktet mindre. For å se om det var mulig å oppkonsentrere mer, ble det gjort forsøk hvor det ble undersøkt hvor liten mengde det var mulig å ha i akseptorbrønnen og fortsatt kunne bruke 96-kanalpipetten. I tillegg ble det sett på om det var mulig å fortynne med mindre mengde Milli-Q-vann. De opprinnelige betingelsene ble sammenlignet med 100 µl akseptorløsning i akseptorbrønnen som ble fortynnet 50/50 og 60/40, ved å ta ut 60 µl fra akseptorbrønnen og fortynne med henholdsvis 60 og 40 µl Milli-Q-vann. Det var mulig å pipettere ut 60 µl fra PALME-platen med 96-kanalpipetten, og resultatene viste at det var mulig å oppnå høyere respons ved å fortynne 60/40. Valideringen ble dermed utført med disse forholdene.

4.2.1 Volumetric Absorptive Microsampling

Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) ble for første gang kombinert med PALME, basert på erfaringer fra tidligere studier hvor DBS er undersøkt for ekstraksjon med PALME [52].

Tradisjonell prøveopparbeidelse med DBS-kort innebærer at analyttene frigjøres i et polart organisk løsemiddel blandet med vann, som deretter sentrifugeres [52]. Supernatanten analyseres enten direkte på LC-MS/MS eller etter at den er inndampet og reløst i passende løsemiddel. Noen analytter frigjøres sakte fra DBS-kortet, noe som gjør metoden tidskrevende, og kan føre til lave utbytter av analytt. I tillegg gir metoden lav opprensing av blodprøven, noe som kan føre til undertrykket eller forsterket ioneintensitet i detektoren, og dermed analyser med dårlig nøyaktighet, presisjon og sensitivitet [52]. Prøver som ikke er tilstrekkelig rene inneholder flere komponenter, for eksempel fosfolipider, som kan forurense analyseinstrumentet. En renere prøve kan oppnås ved å utføre en ekstraksjon (LLE eller SPE) av den forurensede prøven. Til sammen gir dette en prøveopparbeidelsesmetode som tar lang tid, med mange arbeidstrinn. Ved å kombinere DBS og PALME kan man få en frigjøring av analytt fra DBS-kortet og ekstraksjon gjennom væskemembranen utført i ett enkelt steg [52]. Det ble vist at når frigjøringen av analytt fra DBS-kortet og ekstraksjonene ble utført i ett enkelt steg, gjorde den kontinuerlige forskyvningen av likevekten i systemet at mer analytt ble frigjort fra DBS-kortet samtidig som at analyttene beveget seg over væskemembranen [52]. Denne studien viste at utbyttet for analyttene ble høyere ved ekstraksjon med PALME enn de ble ved tradisjonell prøveopparbeidelse med DBS alene [52]. PALME gir god opprensing av blodprøven spesielt med tanke på fosfolipider, og er samtidig en effektiv og enkel ekstraksjonsmetode, som potensielt kan automatiseres i større laboratorier [53].

Ettersom det var første gang VAMS og PALME ble kombinert, var det ønsket å undersøke hvordan dette ville påvirke utbytte, variasjon og linearitet. VAMS som prøvetakingsmetode ble sammenlignet med blodprøver pipettert direkte i PALME-platen.

Standardkurver med lineær kurvetilpasning og vektning $1/x$ ble vurdert basert på R^2 (**tabell 4.1**), for blod samlet med VAMS. Prosesseffektiviteten for VAMS sammenliknet med direkte ekstraksjon av 20 μ l blod er vist i **tabell 4.2**.

Tabell 4.1: Stoffklasse, standardområdet for ekstraksjonen og linearitet ved ekstraksjon av standarder, hvor VAMS er brukt som prøvetakingsmetode.

Komponent	Stoffklasse	Standardområde (μM)	R ²
Alprazolam	Benzodiazepin	0,010-0,254	0,994
Diazepam	Benzodiazepin	0,020- 0,506	0,999
Flunitrazepam	Benzodiazepin	0,005-0,127	0,996
Klonazepam	Benzodiazepin	0,004-0,100	0,992
Nitrazepam	Benzodiazepin	0,020- 0,505	0,982
Oksazepam	Benzodiazepin	0,049-1,259	0,997
Zopiklon	Benzodiazepinlignende	0,020-0,502	0,996
Zolpidem	Benzodiazepinlignende	0,020- 0,504	0,997
Morfin	Opioid	0,020-0,506	0,989
Kodein	Opioid	0,020- 0,508	0,994
Oksykodon	Opioid	0,020-0,503	0,995
Tramadol	Opioid	0,020-0,507	0,998
Metadon	Opioid	0,019-0,500	0,995
Kokain	Sentralstimulerende rusmiddel	0,005-0,126	0,997
Amfetamin	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020-0,503	0,993
Metamfetamin	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020-0,504	0,999
MDMA	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020- 0,505	0,999

Tabell 4.2: pKa-verdier og Log P-verdier for rusmidlene og prosesseffektivitet til stoffene (n=6) fra fullblod, hvor VAMS som prøvetakingsmetode er sammenlignet med blod pipettert direkte i PALME-platen.

Komponent	Basisk pKa	Log P	VAMS Prosesseffektivitet (RSD i %)	Bloddråpe Prosesseffektivitet (RSD i %)
Alprazolam	5,0	3,0	77(13)	70(5)
Diazepam	2,9	3,1	82(10)	80(1)
Flunitrazepam	1,7	2,6	98(13)	93(5)
Klonazepam	1,6	2,5	102(16)	97(6)
Nitrazepam	2,7	2,6	92(18)	88(11)
Oksazepam	-1,5	2,9	99(11)	94(2)
Zopiklon	6,7	2,7	47(16)	32(26)
Zolpidem	5,4	3,0	92(9)	89(1)
Morfin	9,1	0,9	12(16)	11(12)
Kodein	9,2	1,3	45(14)	44(6)

Oksykodon	7,6	1,6	105(11)	104(6)
Tramadol	9,6	2,3	120(14)	107(11)
Metadon	9,1	3,9	93(19)	103(3)
Kokain	9,0	2,3	119(12)	94(14)
Amfetamin	10,1	1,8	43(10)	42(11)
Metamfetamin	10,4	2,2	67(14)	65(3)
MDMA	10,1	1,9	64(10)	63(3)

Man kan se av resultatene presentert i **tabell 4.1** at lineariteten ved ekstraksjon av standarder hvor VAMS er benyttet som prøvetakingsmetode stort sett er tilfredsstillende ($R^2 \geq 0,99$), men med noen unntak. Stoffene har varierende prosesseffektivitet (**tabell 4.2**). Prøvetaking med VAMS gav resultater med lavere presisjon enn blod som ble pipettert direkte i PALME-platen.

I en studie ble mengde blod absorbert av VAMS ved ulike hematokrit-verdier, undersøkt ved seks ulike laboratorier [17]. Mengde blod samlet av VAMS varierte innenfor akseptable grenser, likevel ble det sett at det var forskjell på det laveste og det høyeste volumet som ble absorbert av «prøvesvampen». VAMS skal i teorien absorbere nøyaktig 10 eller 20 µl. Mulige grunner til variasjon i mengde blod på «prøvesvampen», kan komme av variasjon mellom ulike produksjonsparti fra produsenten, eller fra hvordan operatør utfører prøvetakingen [17]. Dersom operatør for eksempel dypper «prøvesvampen» for langt ned i blodprøven, eller kommer borti en overflate etter prøvetaking kan dette gi opphav til avvik [17]. Selv om det er snakk om små feilkilder, kan det gi relevante utslag ettersom det blir arbeidet med veldig små mengder blod med analytter til stede i svært lave konsentrasjoner.

4.3 Metodevalidering

Innledningsvis ble det satt et mål om å optimalisere en metode som ekstraherte 20 rusmidler og viktige legemidler i en robust og effektiv analysemetode. Helt fra starten viste det seg at THC ikke var mulig å få til å gå over væskemembranen selv med analytt til stede i høy konsentrasjon. Dette resultatet var ikke uventet siden THC er svært upolar og ikke har noen basefunksjon. THC ble dermed ekskludert fra metoden tidlig i forløpet. Buprenorfin ble forsøkt optimalisert, men viste fra tidlig i optimaliseringen at den krevde andre betingelser

enn de mer polare analyttene. Det ble forsøkt å finne en metode som ekstraherte buprenorfin med god prosesseffektivitet, helt frem til valideringen. Ved endelige betingelser var signalet til buprenorfin i laveste standard for lavt, og analytten ble ekskludert før valideringen. Det ble følgelig utført en metodevalidering for 18 analytter, med VAMS som prøvetakingsmetode. Følgende parametere ble inkludert i valideringen: linearitet, nøyaktighet og presisjon, minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), minste detekterbare konsentrasjon (MDK), ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, spesifisitet og overdrag.

4.3.1 Linearitet

Lineariteten beskriver forholdet mellom konsentrasjon av analytt i prøven og responsen i detektor. R^2 nær 1 tyder på god linearitet. Ved god linearitet vil responsen i detektor korrelere med hvor høy konsentrasjon av analytten som er tilstede i prøven.

Lineariteten ble bestemt for konsentrasjonsområde 0,2–500 ng/ml. Konsentrasjon for kontroller og standarder er oppsummert i **tabell 3.11** og **3.12**. Kalibreringskurvene for forsøk 1 er lagt ved (se **vedlegg 4**).

Tabell 4.3: Korrelasjonskoeffisienter fra kalibreringskurve vedlagt i vedlegg 4.

Analytt	Forsøk 1 R^2	Forsøk 2 R^2
Alprazolam	0,993	0,995
Diazepam	0,994	0,995
Flunitrazepam	0,989	0,996
Klonazepam	0,997	0,999
Nitrazepam	0,985	0,987
Oksazepam	0,997	0,993
Zopiklon	0,999*	0,950*
Zolpidem	0,994	0,996
Morfin	0,991	0,996
Kodein	0,983	0,998
Oksykodon	0,995	0,997
Tramadol	0,996	0,991
Metadon	0,996	0,994
Kokain	0,997	0,995
Amfetamin	0,992	0,997
Metamfetamin	0,998	0,998
MDMA	0,995	0,995
Fentanyl	0,989	0,984

* For zopiklon ble det brukt kvadratisk kurvetilpassing.

Tabell 4.3 oppsummerer analyttenes korrelasjonskoeffisienter fra to ulike forsøk. For at metoden skal kunne brukes til kvantifisering bør korrelasjonskoeffisienten være $\geq 0,99$. Alle analyttene har tilfredsstillende korrelasjonskoeffisienter med unntak av flunitrazepam, nitrazepam, kodein og fentanyl fra forsøk 1, og nitrazepam, zopiklon og fentanyl fra forsøk 2 (uthevet i **tabell 4.3**). Lavere verdier kan aksepteres, avhengig av hva metoden skal benyttes til [47]. Fra kurvene i forsøk 1 (**vedlegg 4**) kan man se at et punkt (standard 5) avviker ved å ligge litt lavere enn resten av punktene på linjen. Linearitet har tidligere vist seg å være en utfordring ved ekstraksjon med PALME med PVDF-membran [9]. Andre grunner for utilfredsstillende korrelasjonskoeffisient kan være feil ved pipettering av standard 5, eller variasjoner i analyseinstrumentet.

4.3.2 Nøyaktighet og presisjon

Nøyaktighet angir forskjellen mellom målt analyseresultat og en teoretisk referanseverdi, og skal sikre at det ikke er systematiske feil ved metoden [47]. Nøyaktighet oppgis som relativ feil. Relativ feil ble beregnet med **ligning 10**.

Presisjon bestemmer grad av spredning i analyseresultatet. Presisjon oppgis som relativt standardavvik (RSD). RSD-verdi ble beregnet med **ligning 11**.

Kriterier for nøyaktighet og presisjon, både for innen- og mellom-serie-variasjon er relativ feil på $\pm 15\%$ og RSD verdi under 15% . For prøver nær minste kvantifiserbare konsentrasjon er relativ feil på $\pm 20\%$, og RSD verdi under 20% godkjent [54].

Repeterbarhet (innen-serie-variasjon)

Resultatet for presisjon og nøyaktighet innen serie er presentert i **Tabell 4.4**.

Tabell 4.4: Repeterbarhet (Teoretiske og målte konsentrasjoner er oppgitt som ng/ml)

Forbindelse		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
		n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Alprazolam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	3,1	23	79
	RSD	10 %	5 %	9 %	9 %
	Relativ feil	-10 %	2 %	-7 %	6 %
Diazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,5	3,0	24	81
	RSD	4 %	8 %	5 %	4 %

	Relativ feil	3 %	0 %	-5 %	8 %
Flunitrazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,5	3,2	24	81
	RSD	7 %	10 %	8 %	6 %
	Relativ feil	2 %	5 %	-4 %	8 %
Klonazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	3,0	24	80
	RSD	11 %	10 %	9 %	10 %
	Relativ feil	-4 %	1 %	-3 %	7 %
Nitrazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,6	3,0	23	86
	RSD	10 %	9 %	5 %	8 %
	Relativ feil	5 %	-1 %	-8 %	14 %
Oksazepam	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,1	14	119	393
	RSD	10 %	6 %	11 %	8 %
	Relativ feil	-5 %	-5 %	-5 %	5 %
Zopiklon	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	3,1	27	72
	RSD	15 %	22 %	5 %	4 %
	Relativ feil	-6 %	2 %	9 %	-4 %
Zolpidem	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,5	3,0	25	83
	RSD	8 %	8 %	5 %	5 %
	Relativ feil	-1 %	-2 %	1 %	11 %
Morfin	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	6,9	16	143	440
	RSD	21 %	8 %	8 %	6 %
	Relativ feil	-8 %	5 %	14 %	17 %
Kodein	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,1	14	131	439
	RSD	16 %	16 %	10 %	12 %
	Relativ feil	-6 %	-9 %	4 %	17 %
Oksykodon	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,4	16	123	400
	RSD	7 %	5 %	3 %	5 %
	Relativ feil	-2 %	5 %	-2 %	7 %
Tramadol	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,4	15	121	400
	RSD	9 %	7 %	5 %	6 %
	Relativ feil	-1 %	0 %	-3 %	7 %
Metadon	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,7	15	120	392
	RSD	12 %	10 %	9 %	9 %

	Relativ feil	3 %	-2 %	-4 %	5 %
Kokain	Teoretisk	1,5	3	25	75
	Målt	1,4	2,9	27	82
	RSD	11 %	17 %	8 %	7 %
	Relativ feil	-7 %	-3 %	6 %	10 %
Amfetamin	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,6	14	126	420
	RSD	12 %	11 %	7 %	7 %
	Relativ feil	2 %	-6 %	1 %	12 %
Metamfetamin	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,2	15	124	408
	RSD	3 %	7 %	4 %	6 %
	Relativ feil	-4 %	3 %	-1 %	9 %
MDMA	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,1	15	124	413
	RSD	5 %	7 %	5 %	5 %
	Relativ feil	-6 %	-2 %	-1 %	10 %
Fentanyl	Teoretisk	0,30	0,60	5,0	15
	Målt	0,32	0,56	4,6	16
	RSD	10 %	10 %	10 %	10 %
	Relativ feil	8 %	-6 %	-9 %	4 %

Repetierbarheten var innenfor gitte kriterier for alle analyttene, unntatt for zopiklon, morfin, kokain og kodein. Verdiene som var utenfor kriterier for nøyaktighet og presisjon er uthevet i **tabell 4.4**.

Mellom-serie-variasjon

Tabell 4.5: Mellom-serie-variasjon (teoretiske og målte konsentrasjoner er oppgitt som ng/ml)

Forbindelse		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
		n= 23	n= 24	n= 23	n= 24
Alprazolam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,5	3,1	26	79
	RSD	14 %	9 %	17 %	11 %
	Relativ feil	0 %	2 %	6 %	6 %
Diazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	2,9	25	79
	RSD	10 %	8 %	11 %	10 %
	Relativ feil	-4 %	-3 %	1 %	5 %
Flunitrazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,6	3,0	23	72

	RSD	14 %	9 %	18 %	18 %
	Relativ feil	8 %	0 %	-7 %	-4 %
Klonazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	3,0	25	80
	RSD	16 %	13 %	12 %	13 %
	Relativ feil	-6 %	2 %	2 %	7 %
Nitrazepam	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,5	2,8	24	77
	RSD	19 %	21 %	10 %	14 %
	Relativ feil	0 %	-6 %	-2 %	3 %
Oksazepam	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,4	15	126	394
	RSD	14 %	12 %	12 %	10 %
	Relativ feil	-1 %	-2 %	1 %	5 %
Zopiklon	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	3,1	29	70
	RSD	25 %	23 %	33 %	20 %
	Relativ feil	-6 %	5 %	16 %	-6 %
Zolpidem	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	2,8	24	76
	RSD	14 %	13 %	17 %	14 %
	Relativ feil	-8 %	-7 %	-2 %	2 %
Morfin *	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	8,4	17	136	391
	RSD	35 %	35 %	14 %	19 %
	Relativ feil	11 %	14 %	9 %	4 %
Kodein	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,5	14	134	395
	RSD	21 %	17 %	20 %	14 %
	Relativ feil	0 %	-6 %	7 %	5 %
Oksykodon	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	6,8	14	124	373
	RSD	19 %	12 %	16 %	16 %
	Relativ feil	-9 %	-5 %	-1 %	-1 %
Tramadol	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,4	15	126	387
	RSD	12 %	8 %	11 %	8 %

	Relativ feil	-1 %	1 %	1 %	3 %
Metadon	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,2	15	130	394
	RSD	14 %	14 %	14 %	15 %
	Relativ feil	-4 %	-1 %	4 %	5 %
Kokain	Teoretisk	1,5	3,0	25	75
	Målt	1,4	2,9	26	78
	RSD	11 %	14 %	10 %	6 %
	Relativ feil	-6 %	-3 %	6 %	3 %
Amfetamin	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,5	14	124	377
	RSD	14 %	14 %	19 %	16 %
	Relativ feil	0 %	-4 %	0 %	1 %
Metamfetamin	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,7	16	128	392
	RSD	9 %	7 %	15 %	10 %
	Relativ feil	2 %	4 %	2 %	5 %
MDMA	Teoretisk	7,5	15	125	375
	Målt	7,4	15	127	387
	RSD	9 %	8 %	14 %	10 %
	Relativ feil	-1 %	0 %	2 %	3 %
Fentanyl	Teoretisk	0,30	0,60	5,0	15
	Målt	0,28	0,51	4,0	14
	RSD	24 %	20 %	28 %	25 %
	Relativ feil	-7 %	-14 %	-13 %	-6 %

* n=	kontroll 4	22
	Kontroll 3	19
	Kontroll 2	23
	Kontroll 1	22

Ti av 18 analytter ble ekstrahert med verdier for presisjon og nøyaktighet som oppfyller gjeldende kriterier. Verdiene som er utenfor kriterier for nøyaktighet og presisjon er uthevet i **tabell 4.5**. Mellom-serie-variasjonen viste spesielt høy variasjon for morfin, zopiklon og fentanyl. Prøvetaking med VAMS er som tidligere nevnt utsatt for noe større variasjoner enn ved pipettering av fullblod direkte i donorbrønningen. Dersom prøvetakingen gjøres på ulik måte, eller er mindre nøyaktig en dag, kan dette slå ut som store avvik for mellom-serie-

variasjon. Andre grunner til store mellom-serie-variasjoner kan være dag til dag variasjoner i LC-MS/MS instrumentet, unøyaktig pipettering, og andre ukjente feil.

4.3.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon

Kvantifiseringsgrensen angir den laveste konsentrasjon av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon med analysemetoden [47].

Den minste kvantifiserbare konsentrasjonen ble satt til konsentrasjon for kontroll 1, se **tabell 3.12**. Samtlige analytter har god nøyaktighet, med relativ feil lavere enn $\pm 20\%$. Dette viser at metoden ikke har systematiske feil. Variasjonen er derimot for høy for noen analytter. Morfin, zopiklon, kodein og fentanyl har ikke akseptabel presisjon ($RSD \geq 20\%$) ved kontroll 1. For disse analyttene bør kvantifiseringsgrensen være høyere enn konsentrasjonen til kontroll 1. Det er også for stor variasjon for flere av de andre kontrollene. Nye forsøk med kurve og kontroller i et høyere område kunne vært foretatt, men det var ikke mulig innenfor oppgavens omfang.

4.3.4 Minste detekterbare konsentrasjon

Deteksjonsgrensen angir den laveste konsentrasjon av analytt som med sikkerhet kan detekteres i prøven med analysemetoden [47]. Analyttene kan påvises i metoden hvis konsentrasjonen i fullblod er større eller lik konsentrasjonene som er oppgitt i **tabell 4.6**.

Tabell 4.6: Minste detekterbare konsentrasjon oppgitt i ng/ml

Analytt	Minste detekterbare konsentrasjon (ng/ml)
Alprazolam	0,2
Diazepam	0,2
Flunitrazepam	0,3
Klonazepam	0,3
Nitrazepam	0,3
Oksazepam	1,7
Zopiklon	0,3
Zolpidem	0,3
Morfin	5
Kodein	1
Oksykodon	0,25
Tramadol	1

Metadon	0,05
Kokain	0,2
Amfetamin	1,7
Metamfetamin	0,5
MDMA	0,25
Fentanyl	0,2

Noen analytter gav for lav respons ved en fem ganger fortykning av laveste standard. Minste detekterbare konsentrasjon ble da bestemt til 1/3 av laveste standard. For morfin og fentanyl ble konsentrasjon lik laveste standard satt til MDK.

4.3.5 Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbyttet angir prosent av analyttrespons etter prøveopparbeidelse, sammenlignet med en løsning som inneholder analytt i en konsentrasjon som korresponderer med 100 % utbytte [54]. Matrikseffekter i ekstrakt kan føre til endret respons for prøvene som har gjennomgått prøveopparbeidelse sammenlignet med standardløsninger i mobilfase. I validering av LC-MS/MS metoder, bør validering av ekstraksjonsutbytte utføres sammen med matrikseffekter [54]. Ekstraksjonsutbyttet skal være uavhengig av biologisk matriks, og testen ble utført med blod fra seks donorer [45].

Tabell 4.7: Ekstraksjonsutbytte og (RSD) i % med korreksjon mot internstandard.

Analytt	Kontroll 2 (n=6)	Kontroll 4 (n=5*)
Alprazolam	85 (14)	78 (6)
Diazepam	91 (12)	89 (9)
Flunitrazepam	111 (14)	107 (16)
Klonazepam	108 (13)	120 (11)
Nitrazepam	94 (14)	115 (23)
Oksazepam	106 (19)	97 (9)
Zopiklon	46 (23)	44 (14)
Zolpidem	108 (12)	106 (11)
Morfin	10 (22)	9 (14)
Kodein	62 (12)	54 (12)
Oksykodon	138 (11)	117 (15)
Tramadol	114 (7)	113 (9)
Metadon	105 (23)	79 (16)
Kokain	111 (10)	109 (11)
Amfetamin	55 (14)	50 (13)
Metamfetamin	72 (10)	73 (9)

MDMA	70 (8)	71 (11)
Fentanyl	136 (24)	86 (21)

* For kontroll 4 ble en av parallellene ekskludert på grunn av systematisk avvik.

Analyttene har varierende ekstraksjonsutbytte. De to kontrollene har utbytter fra 9 % for morfin, til 138 % for oksykodon. Morfin var hele tiden en analytt som var vanskelig å ekstrahere med høy prosesseffektivitet.

Grunnen til at det ble undersøkt for to ulike konsentrasjoner, er at det gir mulighet for å avdekke eventuelt konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte. Resultatene presentert i **tabell 4.7**, viste ikke statistisk signifikant konsentrasjonsavhengig utbytte for alle analyttene, unntatt for fentanyl. Uspesifikk binding av analytt til PVDF-membranen er tidligere observert som mulig grunn for konsentrasjonsavhengig ekstraksjonsutbytte i tidligere studier [27]. Dette er til en viss grad mulig å korrigere ved å tilsette TOA i væskemembranen [27].

4.3.6 Matrikseffekter

Analyse med LC-MS/MS er spesielt utsatt for matrikseffekter. Matrikskomponenter som koeluerer med analytten som skal detekteres, kan undertrykke eller forsterke intensiteten til analyttionene, og påvirke reproduserbarheten og nøyaktigheten til metoden [45]. I denne oppgaven ble Matuszewskis metode benyttet for validering av matrikseffekter [45]. En annen metode som er vanlig å bruke, er post-kolonnieinfusjon [54].

Absolutte og relative matrikseffekter er beregnet, og presentert i **tabell 4.8**. Ved utregning av den absolutte matrikseffekten er responsen av kontroll i ekstrahert fullblod tilsatt analytt etter ekstraksjon sammenlignet med respons av kontroll laget direkte i mobilfase. De relative matrikseffektene er gitt som relativt standardavvik, og viser variasjonen i matrikseffekter mellom blod fra ulike personer. Liten relativ matrikseffekt er svært relevant for å utvikle selektive HPLC-MS/MS metoder [45]. En verdi på 100 % indikerer at responsen for analytt løst i mobilfase, og analytten løst i ekstrakt var den samme, og ingen matrikseffekt var observert. Verdier over og under 100 % sier noe om ioneintensiteten henholdsvis forsterkes eller undertrykkes når analytten er ekstrahert fra den biologiske matriksen [45].

Tabell 4.8: Absolutte matriks effekter og (relative matrikseffekter) i % med korreksjon mot internstandard.

Analytt	Kontroll 2 (n=6)	Kontroll 4 (n=6)
Alprazolam	108 (13)	111 (8)
Diazepam	99 (5)	99 (5)
Flunitrazepam	104 (7)	92 (10)
Klonazepam	110 (19)	97 (8)
Nitrazepam	116 (18)	94 (14)
Oksazepam	100 (5)	104 (10)
Zopiklon	123 (13)	93 (21)
Zolpidem	89 (22)	100 (8)
Morfin	102 (17)	98 (8)
Kodein	91 (12)	102(14)
Oksykodon	78 (8)	102 (5)
Tramadol	100 (6)	97 (5)
Metadon	95 (9)	98 (10)
Kokain	104 (5)	101 (4)
Amfetamin	81 (9)	96 (6)
Metamfetamin	102 (4)	98 (6)
MDMA	102 (7)	98 (7)
Fentanyl	52 (7)	96 (7)

Matrikseffekter for de aller fleste analyttene var innenfor grensen på $\pm 20\%$ (80–120 %). De som lå utenfor grensen er uthevet i **tabell 4.8**. Zopiklon har en matrikseffekt på 123 % for kontroll 2. Dette er så vidt utenfor grensen for tilfeldig variasjon. Det er mulig at ioneintensiteten øker litt, og at en viss konsentrasjonsavhengig matrikseffekt foreligger. Det samme gjelder for oksykodon, som har en tendens til undertrykket ioneintensitet ved kontroll 2. Fentanyl har matrikseffekter i kontroll 2. Dette kan tyde på konsentrasjons- avhengig matrikseffekt, spesielt ettersom konsentrasjonsnivåene for fentanyl er satt lavt i forhold til de andre analyttene. Nye forsøk for matrikseffekt for fentanyl, over flere konsentrasjonsnivåer kunne vært foretatt, men det var ikke mulig innenfor oppgavens omfang.

4.3.7 Selektivitet

Selektivitet er den bioanalytiske metodens evne til å utvetydig detektere og differensiere de analyttene som skal analyseres, uten å la seg påvirke av andre komponenter som kan forventes å være tilstede i prøven. Dette kan inkludere rusmidler eller legemidler som kan finnes i prøvene, metabolitter, urenheter eller matriks-komponenter (eks. fosfolipider) [54].

Avviket mellom forventet konsentrasjon for kontroll 2 og målt konsentrasjon når kontroll 2 var tilsatt blandinger med en rekke forskjellige stoffer (**vedlegg 5**) ble beregnet. **Tabell 4.9** oppsummerer avvik fra forventet konsentrasjon, og hvilken blanding av stoffer som inneholdt potensiell interferens. Det bør gjøres videre forsøk for å undersøke hva som var kilden til observert interferens, men dette var ikke mulig å gjøre innenfor oppgavens omfang.

Tabell 4.9: Avvik fra forventet konsentrasjon og RSD (%).

Analytt	blanding	Avvik	RSD
Amfetamin	4	32	8
Metamfetamin	4	32	6
Morfin	1	24	32
Zolpidem	1	-25	54
Zopiklon	5	-26	4

4.3.8 Overdrag

Signalet til blank prøve som ble analysert rett etter standard 6 og en standard som var 3 ganger høyere enn standard 6, var mindre enn 20 % av signalet til laveste standard for alle analyttene. Tramadol gav signal som var akkurat 20 % for blank analysert etter den høye standarden.

4.4 Ekstraksjon av reelle prøver

Ved ferdig optimaliserte betingelser (se **avsnitt 3.6.3**), ble det utført ekstraksjon av VAMS i PALME på prøver samlet til en veikant-undersøkelse som ble utført for å følge med på utviklingen av rusmiddelbruk i trafikken på Østlandet [46]. Det ble søkt til etisk komité om mulighet til å bruke VAMS som prøvetakingsmetode, i tillegg til spyttprøver, for å evaluere muligheten til å samle blod ved veikanten istedenfor spyttprøver, som er standarden i dag.

Blodprøvene ble bekreftet negative. Spyttprøver fra de samme bilførerne var tidligere analysert etter prøveopparbeidelse ved standardisert metode på Oslo universitetssykehus, Avdeling for rettsmedisinske fag, hvor de ble bekreftet negative.

4.5 Fremtidig bruk

Blod som prøvematriks ved rusmiddeltesting i veikanten vil kunne gi informasjon om grad av påvirkning hos bilfører, noe man ikke kan vurdere ut fra spyttprøver som er den matriksen som benyttes i dag. VAMS som prøvetakingsmetode er mindre invasiv enn tradisjonelle blodprøver, og utføres med et stikk i fingertuppen med en lansett. I praksis var dette vanskeligere enn først antatt, ettersom en eventuell kulde eller stressreaksjon gjorde at det var vanskelig å få ut nok blod fra fingeren. På grunn av fordelene med muligheten til å kunne relatere konsentrasjonen til påvirkningsgrad bør det gjøres ytterligere optimalisering av prøvetakingsprosessen. Det kan i tillegg være hensiktsmessig å videreutvikle konseptet med tanke på andre mulige bruksområder som for eksempel rusmiddeltesting på arbeidsplassen, befolkningsundersøkelser eller oppfølging av LAR-pasienter. Kombinasjonen av prøvetaking med VAMS og ekstraksjon med PALME vil også være aktuell for medikamenter der det gjøres jevnlig legemiddelmonitorering.

5 Konklusjon

Prøveopparbeidelsesmetoden PALME ble i denne oppgaven for første gang kombinert med VAMS som prøvetakingsmetode for rusmidler. Målet var å ende opp med en effektiv ekstraksjonsmetode for 20 av de vanligste stoffene som påvises hos bilførere som er tatt for å være påvirket av rusmidler. Metoden inkluderte et bredt spekter av rusmidler, som var strukturelt ulike. Log P-verdien for analyttene varierte fra 0,9 for morfin til 5,9 for THC. Morfin var utfordrende å ekstrahere i PALME og gav lavere utbytter enn resten av analyttene, som stort sett gav utbytter > 70 %. Basert på analyttens fysikalsk-kjemiske egenskaper med en lav log P-verdi, og med både syre- og base-funksjon var dette å forvente da analytten til en hver tid vil være mer eller mindre ionisert. Ved å inkludere et så bredt spekter av rusmidler, var det ikke mulig å ekstrahere med optimale betingelser for hver enkelt analytt og høye utbytter måtte i noen tilfeller gå på bekostning av ønsket om en generisk metode. To av de mest lipofile rusmidlene, THC og buprenorfin var ikke mulig å inkludere i metoden.

Viktige ekstraksjonsparametere ble optimalisert, og VAMS som prøvetakingsmetode ble sammenlignet med fullblod pipettert direkte i PALME-platen. Lineariteten ved ekstraksjon av standarder hvor VAMS ble brukt som prøvetakingsmetode var stort sett tilfredsstillende, men med noen unntak ($R^2=0,983-0,999$). VAMS som prøvetakingsmetode gav noe lavere presisjon enn dersom blod ble pipettert direkte i PALME-platen. Ut i fra forutsetningene gav den optimaliserte metoden svært lovende resultater. Ved endelige ekstraksjonsbetingelser ble 18 av stoffene validert. Måling i 20 µl blod samlet inn med VAMS ga deteksjonsgrenser som er sammenliknbare med rutineanalyser av stoffene i veitrafikksaker. Valideringsresultatene var stort sett innenfor interne retningslinjer ved OUS, men presisjonen var noe lavere enn ønskelig for enkelte stoffer. Det er mulig at en lavere presisjon er å forvente da over/undersampling i mikroliterområdet kan gi store utslag når blodprøver med lav konsentrasjon analytt samles opp med et volum på 20 µl med VAMS. Analyse av analyttene sammen med blandinger av et bredt utvalg av legemidler og rusmidler ble testet, og for noen av analyttene ble det kvantitative resultatet påvirket, slik at videre forsøk bør gjøres for å identifisere interfererende analytter. Det ble ikke observert problemer med overdrag i metoden.

Kombinasjonen av PALME og VAMS viste lovende resultater for ekstraksjon av rusmidler, og mye av grunnlaget for en effektiv prøveopparbeidelsesmetode er lagt. Noe videre arbeid

må gjøres før metoden potensielt kan anvendes i et rutinelaboratorium. Kombinasjonen gjør at man kan unngå et ekstra arbeidstrinn, ved at frigjøring av analytt fra VAMS og ekstraksjon gjennom væskemembranen utføres i ett enkelt steg. Selve ekstraksjonsprosessen tar bare 60 minutter, og ekstraktet kan injiseres direkte i LC-MS/MS. Det viste seg utfordrende å få nok blod til VAMS for alle sjåførene som ble stoppet i veikanten, og prøvetakingssteget må derfor optimaliseres. I tillegg ville det være interessant å se om konseptet kan ha andre aktuelle bruksområder som ved rusmiddeltesting på arbeidsplassen, befolkningsundersøkelser eller for oppfølging av LAR pasienter.

Litteraturliste

1. Oslo Universitetssykehus. *Trafikkulykker og rusmidler*. 2017 [cited 10.11 2017]; Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rettsmedisinske-fag/alkohol-og-rusmidler/trafikkulykker-og-rusmidler>.
2. World Health Organization. *Road traffic injuries*. 2018 [cited 27.03 2018]; Tilgjengelig fra: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs358/en/>.
3. Velghe, S., R. De Troyer, and C. Stove, *Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2018. **14**(1): p. 1-3.
4. Wille, M.R.S., et al., *Relationship Between Oral Fluid and Blood Concentrations of Drugs of Abuse in Drivers Suspected of Driving Under the Influence of Drugs*. Therapeutic Drug Monitoring, 2009. **31**(4): p. 511-519.
5. Pedersen-Bjergaard, S., *Introduction*, in *Bioanalysis of pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons. p. 1-7.
6. Pedersen-Bjergaard, S., A. Gjelstad, and T.G. Halvorsen, *Sample Preparation*, in *Bioanalysis of pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons. p. 73-122.
7. Majors, R.E., *Sample preparation fundamentals for chromatography*. Vol. 2018. 2013, Wilmington, DE: Agilent Technologies. 364.
8. Gjelstad, A., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): p. 1377-1385.
9. Gjelstad, A., et al., *High-throughput liquid-liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction*. LC-GC North America, 2017. **35**(3): p. 192-196.
10. Dietrichs, E.S. and J. Mørland, *Rusmidler*, in *Store Norske leksikon*, E.S. Dietrichs, Editor. 2017.
11. Oslo Universitetssykehus, Avdeling for rettsmedisinske fag. *Rusmiddelstatistikk Funn i blodprøver hos bilførere mistenkt for påvirket kjøring 2017*. 2018 [cited 14.04 2018]; Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rettsmedisinskefag/alkohol-og-rusmidler>.
12. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalyse av legemidler*, in *Legemiddelanalyse*, S. pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 452-487.
13. Nys, G., et al., *Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications*. Trends in Analytical Chemistry, 2017. **97**: p. 326-332.
14. Li, W., F.L.S. Tse, and N.R. Srinivas, *Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules*. 2010: Chichester, UK. p. 49-65.
15. *Hematocrit*. 2018 20.02.2018 [cited 25.04 2018]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/hematokrit>.
16. Mano, Y., K. Kita, and K. Kusano, *Hematocrit-independent recovery is a key for bioanalysis using volumetric absorptive microsampling devices, Mitra(TM)*. Bioanalysis, 2015. **7**(15): p. 1821-1829.
17. Spooner, N., *A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit*. Bioanalysis, 2015. **7**(6): p. 653-659.

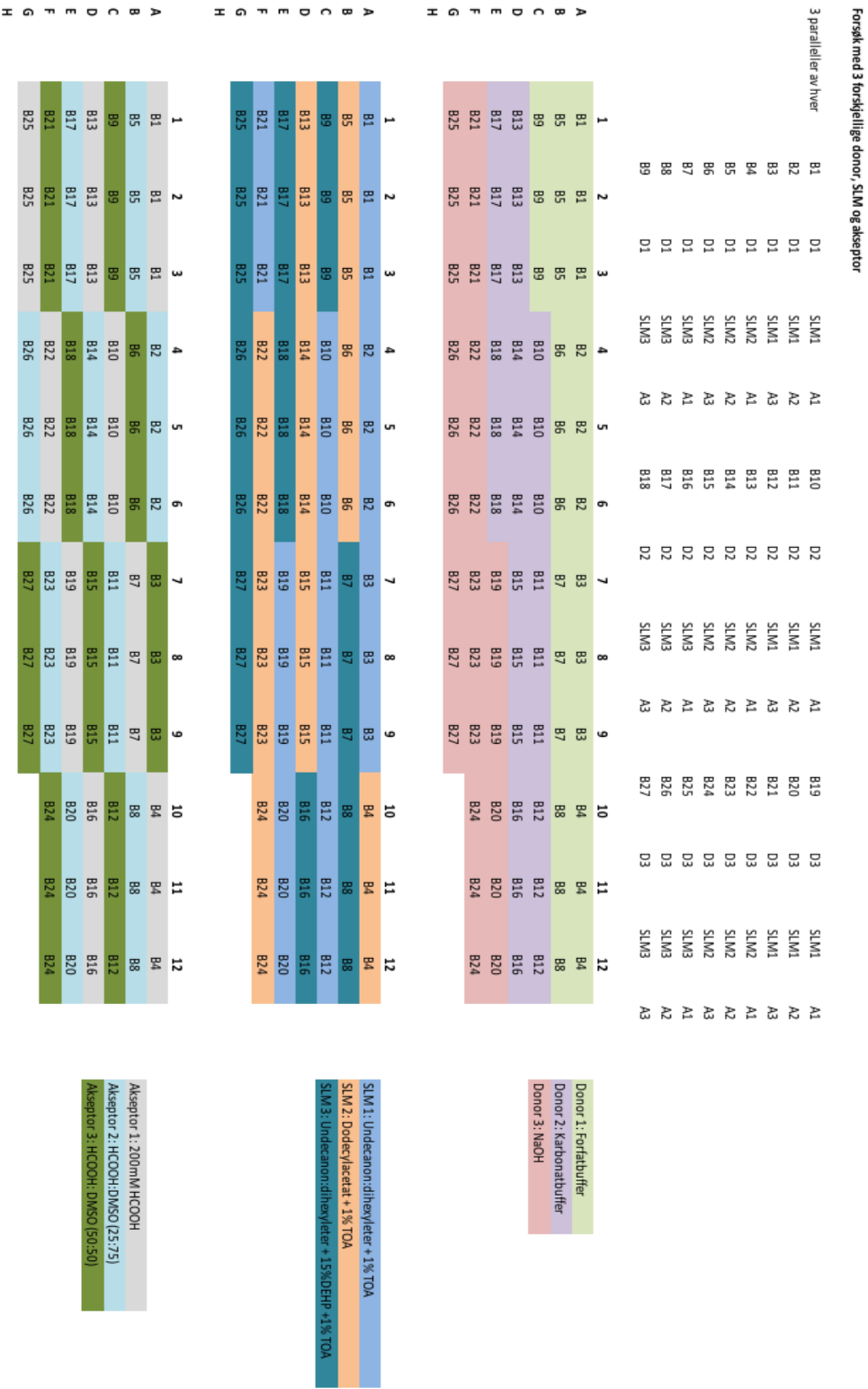
18. Kip, A.E., et al., *Volumetric absorptive microsampling (VAMS) as an alternative to conventional dried blood spots in the quantification of miltefosine in dried blood samples*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017. **135**: p. 160-166.
19. Hansen, S.H., *Biological Samples: Their Composition and Properties, and Their Collection and Storage*, in *Bioanalysis of pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons. p. 23-29.
20. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Introduksjon til prøveopparbeidelse*, in *Legemiddelanalyse*, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 276-281.
21. Hansen, S.H. and S. Pedersen-Bjergaard, *Physicochemical Properties og Drug Substances*, in *Bioanalysis of pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons. p. 9-22.
22. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Væske-væske-ekstraksjon (LLE)*, in *Legemiddelanalyse*, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 282-291.
23. Sharifi, V., A. Abbasi, and A. Nosrati, *Application of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid-liquid microextraction techniques in analytical toxicology*. Journal of Food and Drug Analysis, 2016. **24**(2): p. 264-276.
24. Pedersen-Bjergaard, S. and K. Rasmussen, *Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis*. Anal. Chem., 1999. **71**(14): p. 2650-2656.
25. Gjelstad, A. and S. Pedersen-Bjergaard, *Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions*. Scientia Chromatographica, 2013. **5**(3): p. 181-189.
26. Sarafraz-Yazdi, A. and A. Amiri, *Liquid-phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry, 2010. **29**(1): p. 1-14.
27. Vardal, L., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood*. J. Chromatogr. B, 2017. **1048**: p. 77-84.
28. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Omvendt-fase-kromatografi*, in *Legemiddelanalyse*, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 162-169.
29. McDonald P.D., M.D., Alden B. A., Lawrence N., Walsh D. P, Iraneta P. C., Grumbach E., Xia F. and Hong P. *Designing a Reversed-Phase Column for Polar Compound Retention*. 2007.
30. LCGC. *Getting the Most from Phenyl Stationary Phases for HPLC*. 2016 [cited 21.04 2018]; Tilgjengelig fra: <http://www.chromatographyonline.com/getting-most-phenyl-stationary-phases-hplc?pageID=1>.
31. LCGC *Evaluation of Retention and Selectivity Using Biphenyl Stationary Phases*. 2017 [cited 21.04 2018]; Volume 35, Issue 6, pg 360–365:[Tilgjengelig fra: <http://www.chromatographyonline.com/evaluation-retention-and-selectivity-using-biphenyl-stationary-phases-0?pageID=1>].
32. Hansen, S.H. and L. Reubsæet, *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High- Performance Liquid Chromatography- Mass Spectrometry (LC-MS)*, in *Bioanalysis of pharmaceuticals*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons. p. 123-172.
33. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Apparatur for væskrokromatografi (HPLC)*, in *Legemiddelanalyse*, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 173-189.

34. Lundanes, E., *Chapter 1: General Concepts*, in *Chromatography : Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*, E. Lundanes, Editor. 2013, Wiley-VCH: [N.p.].
35. Hayes, R., et al., *Core-Shell Particles: preparation, fundamentals and applications in HPLC*. Journal of Chromatography A, 2014.
36. *H-ESI probe User Guide*. 2009, Thermo Fisher Scientific.
37. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Massespektrometri*, in *Legemiddelanalyse*, S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 246-275.
38. Greaves, J. and J. Roboz, *Mass Spectrometry for the Novice*. 2014, Boca raton, FL, USA.: CRC Press Taylor & Francis Group.
39. Schwartz, J., M. Senko, and J. Syka, *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): p. 659-669.
40. Douglas, D.J., A.J. Frank, and D. Mao, *Linear ion traps in mass spectrometry*. 2005: Hoboken. p. 1-29.
41. ChemAxon Ltd. *Chemicalize*. 1998-2017 [cited 21.03 2018]; Tilgjengelig fra: <https://chemicalize.com/#/structure-search>.
42. Wong, G., *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av basiske upolare substanser og benzodiazepiner*, in *Avdeling Farmasøytisk Kjemi og Avdeling for rettsmedisinske fag*. 2017, Universitetet i oslo (UiO): OSLO. p. 99.
43. *instructions for use Mitra® 96-rack format*. neoteryx: Torrance, CA, USA.
44. European Medicines Agency, Committee for medicinal Products for Human Use. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011 [cited 16.03 2018]; Tilgjengelig fra: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
45. Matuszewski, B.K., M.L. Constanzer, and C.M. Chavez-Eng, *Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(13): p. 3019-3030.
46. Oslo Universitetssykehus, Avdeling for rettsmedisinske fag. *Bruk av alkohol, andre rusmidler og trafikkfarlige legemidler blant motorvognførere i normal veitrafikk på Østlandet i 2016-17*. 2018 [cited 01.05 2018]; Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/rettsmedisinske-fag>.
47. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Kvalitetsstandarder*, in *Legemiddelanalyse*, S. pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, Editors. 2010, Fagbokforlaget: Bergen. p. 488-500.
48. Pilařová, V., et al., *One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction*. Journal of Chromatography B, 2017. **1043**: p. 25-32.
49. Roldán-Pijuán, M., S. Pedersen-Bjergaard, and A. Gjelstad, *Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(10): p. 2811-2819.
50. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane*. Analytica Chimica Acta, 2016. **934**: p. 80-87.
51. Eskandari, M., et al., *Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **54**(5): p. 1173-1179.

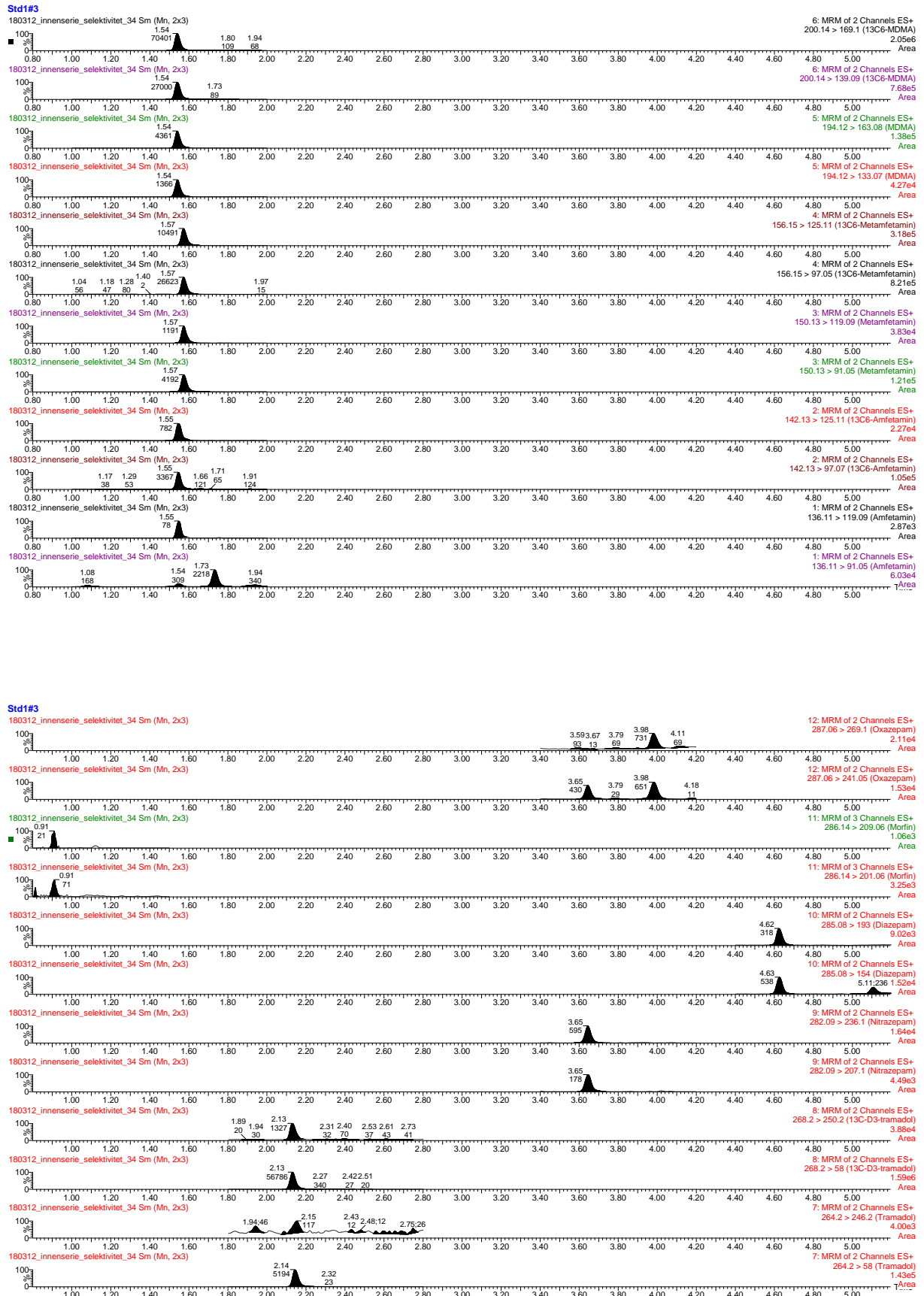
52. Ask, K.S., et al., *Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction*. *Analytica Chimica Acta*, 2018. **1009**: p. 56-64.
53. Ask, K.S., et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016. **129**: p. 229-236.
54. Peters, F.T., O.H. Drummer, and F. Musshoff, *Validation of new methods*. *Forensic Science International*, 2007. **165**(2): p. 216-224.

Vedlegg

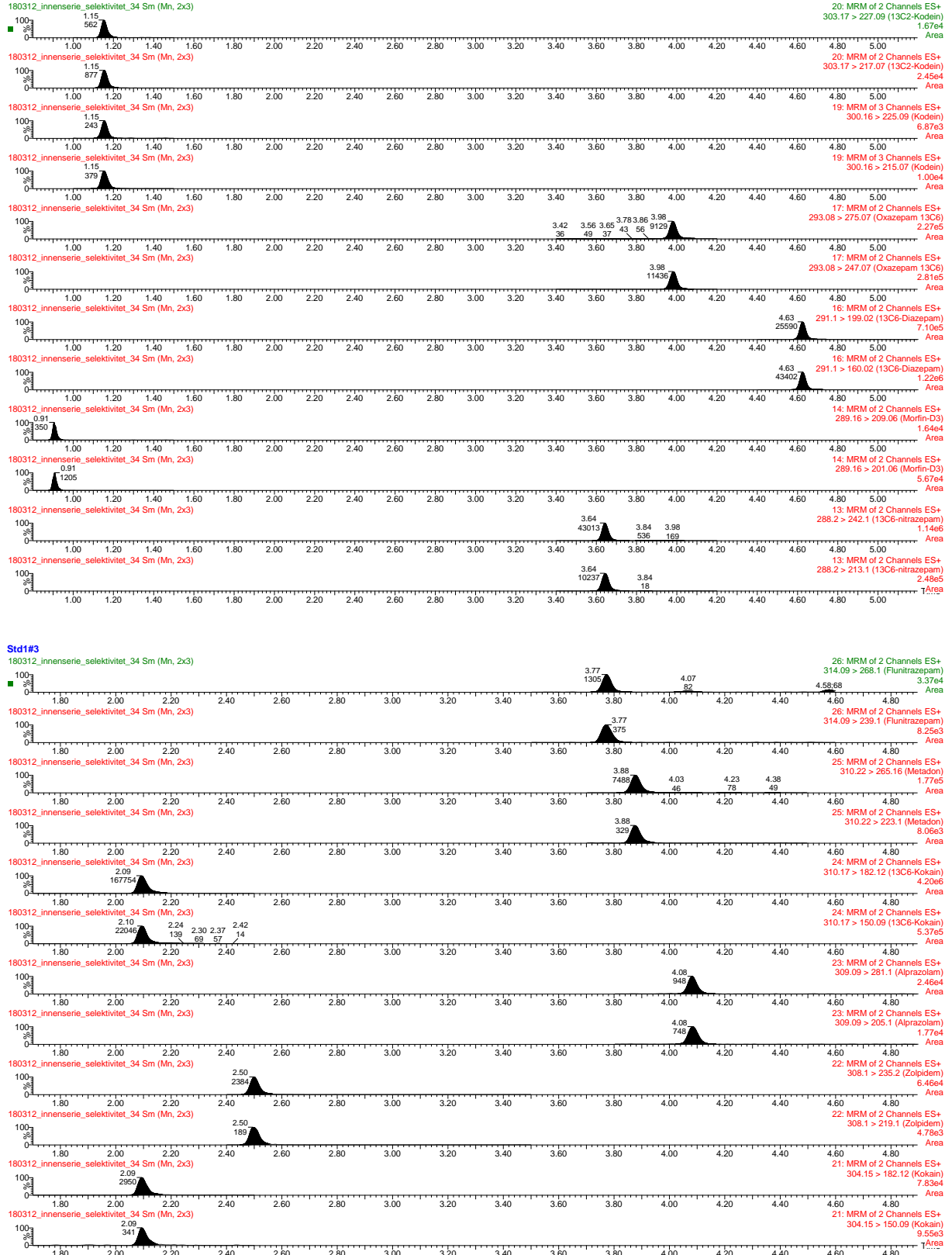
Vedlegg 1: Tre buffere, akseptorløsninger og organiske væskemembraner, kombinert til 27 ulike betingelser



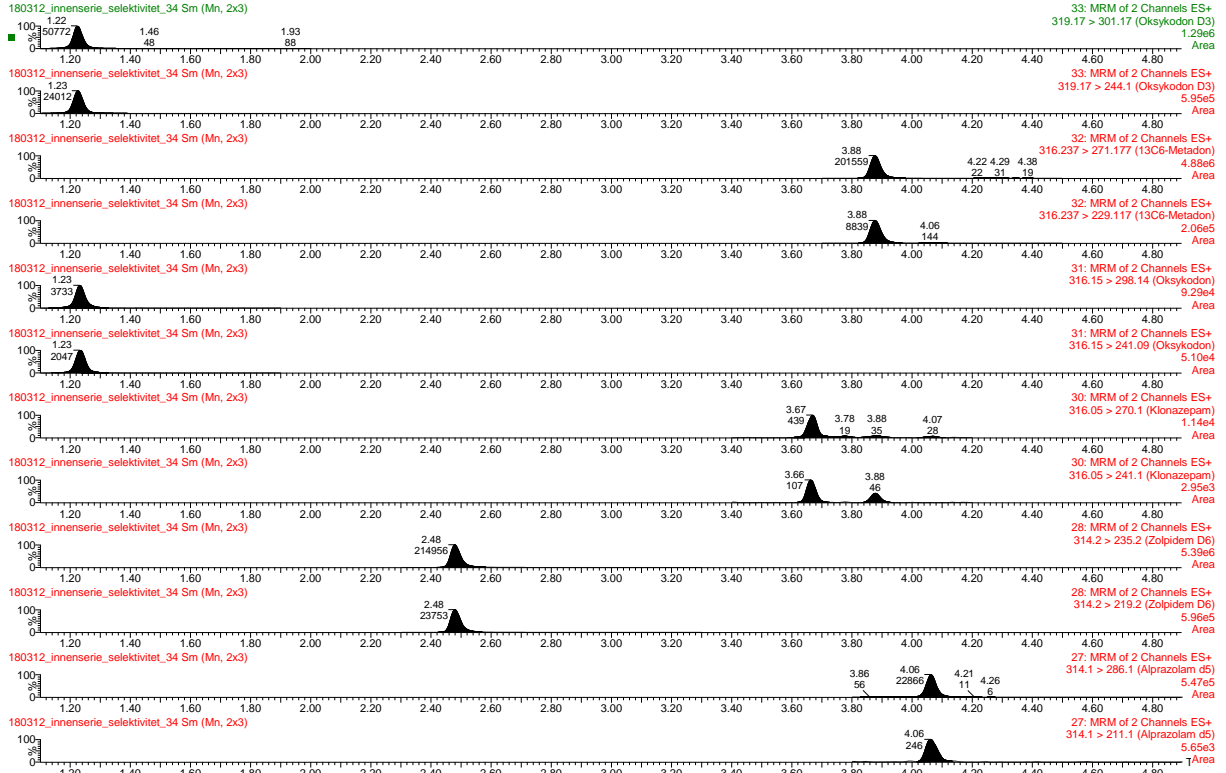
Vedlegg 3: Kromatogrammer for analyttene og internstandarder. Hver analytt og internstandard måler for to overganger



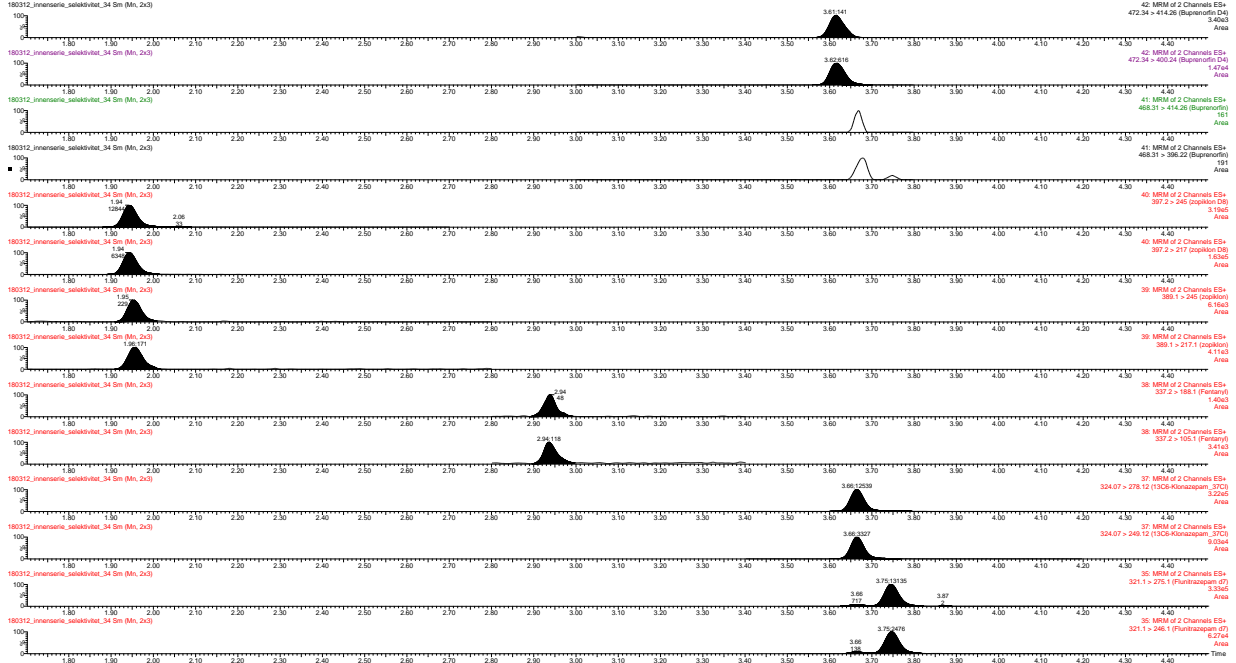
Std1#3



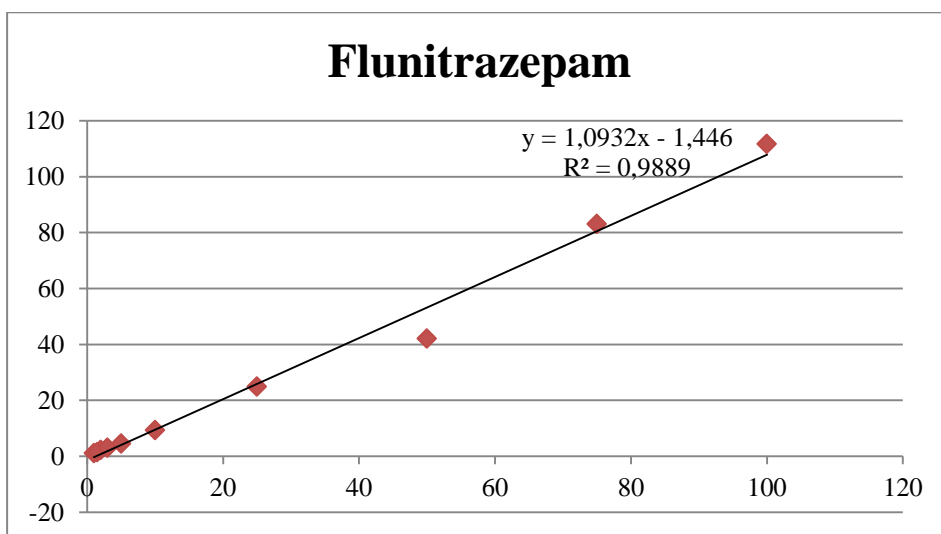
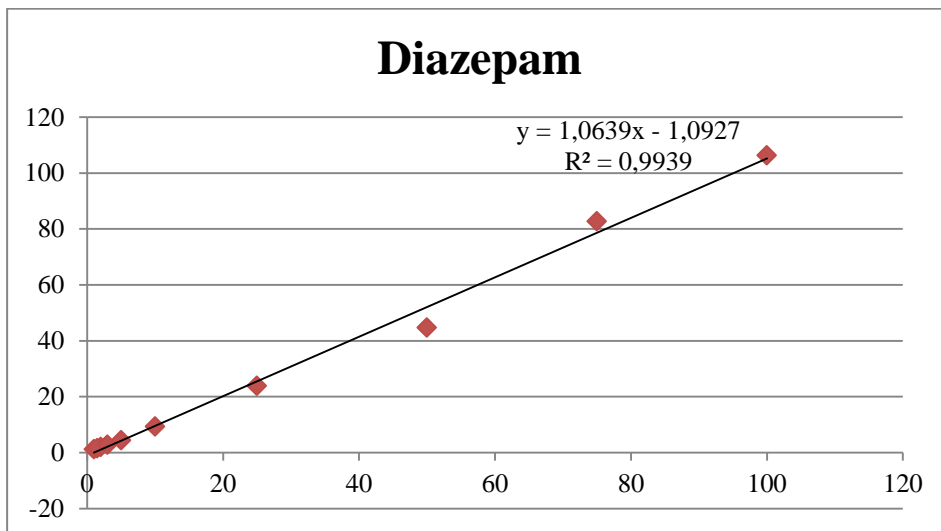
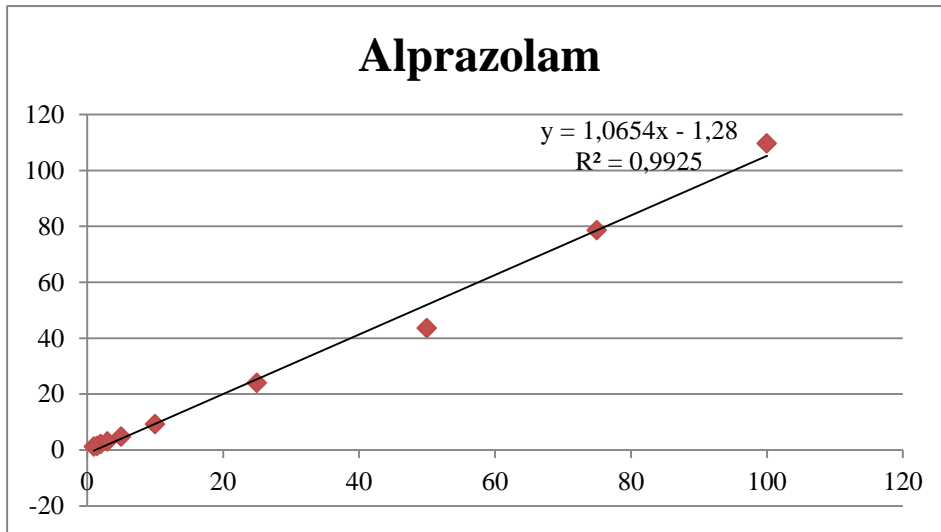
Std1#3

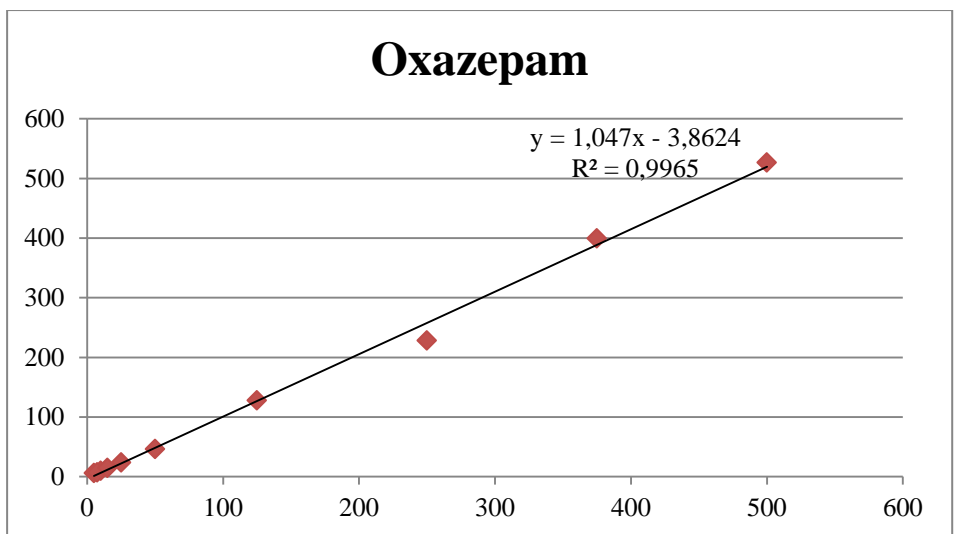
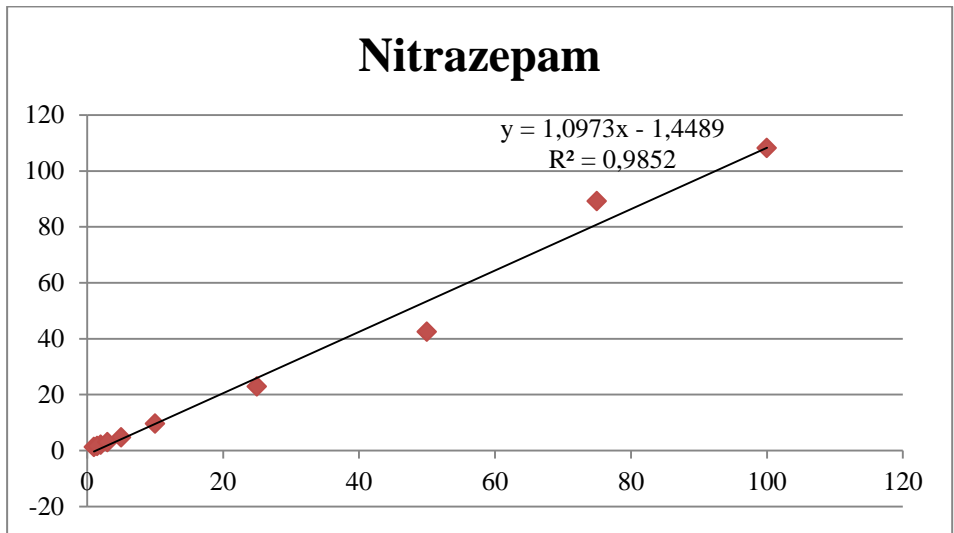
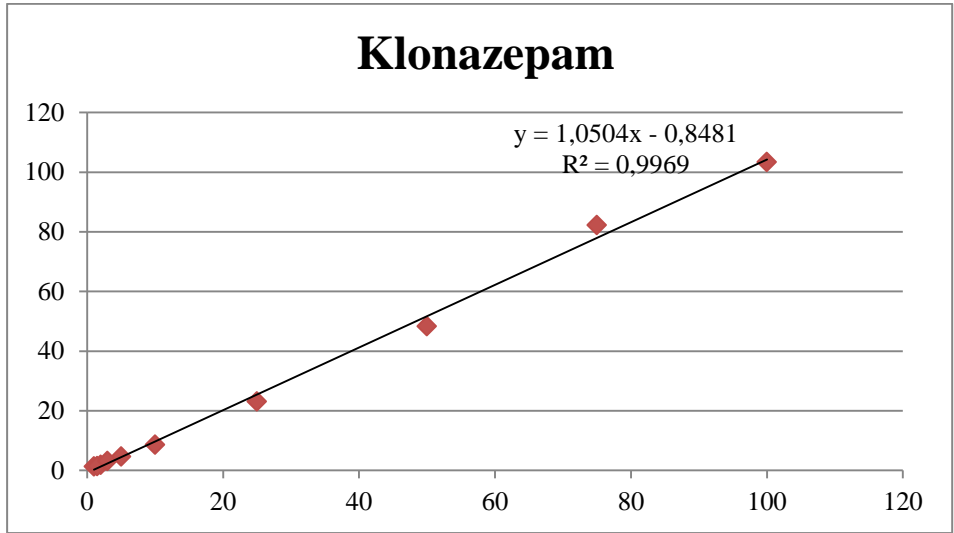


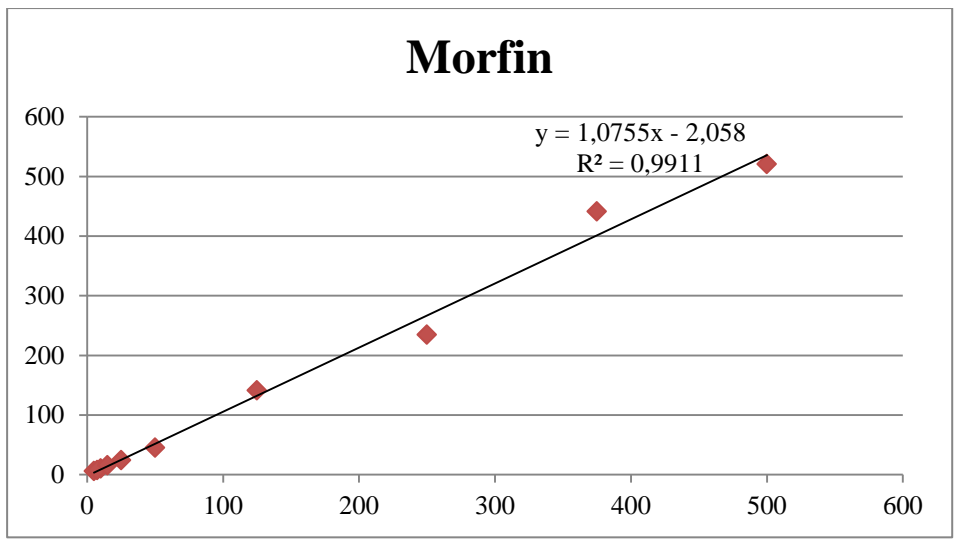
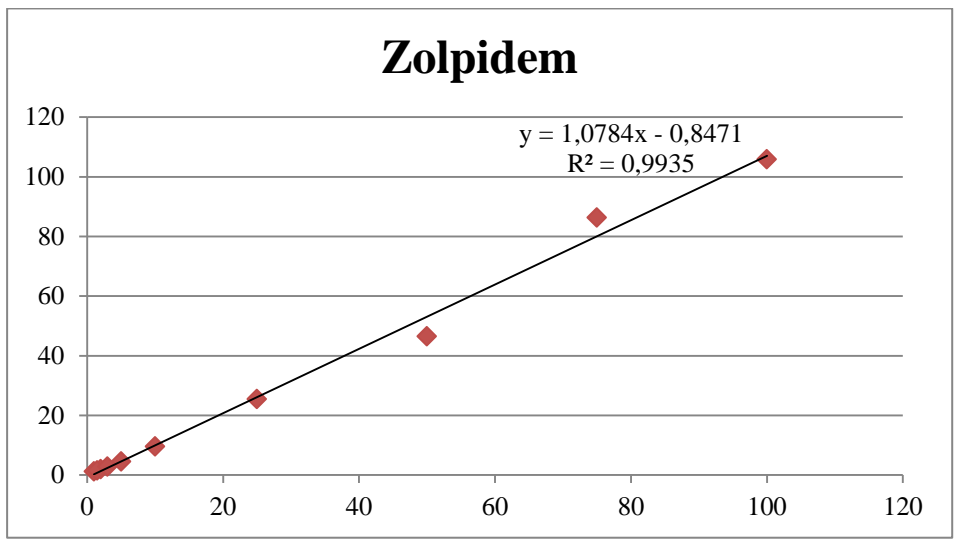
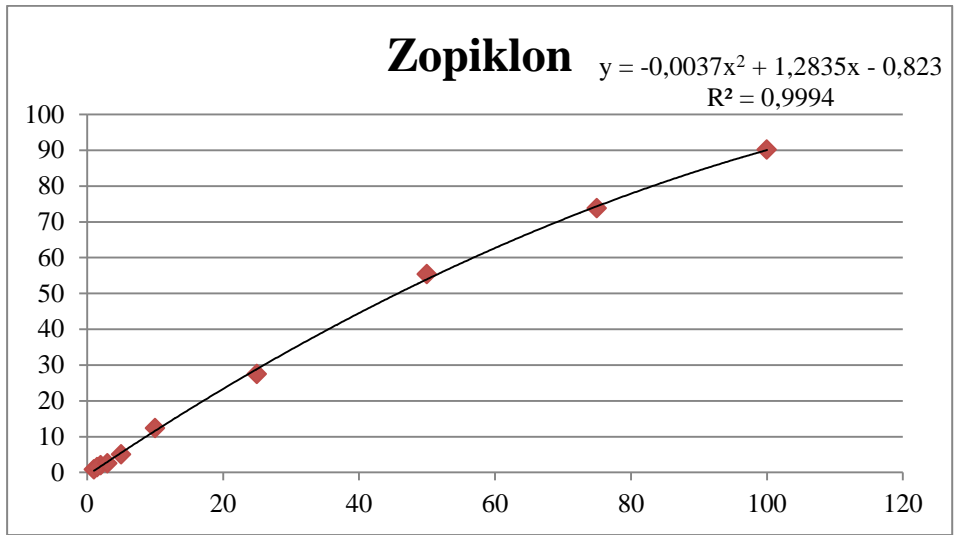
Series

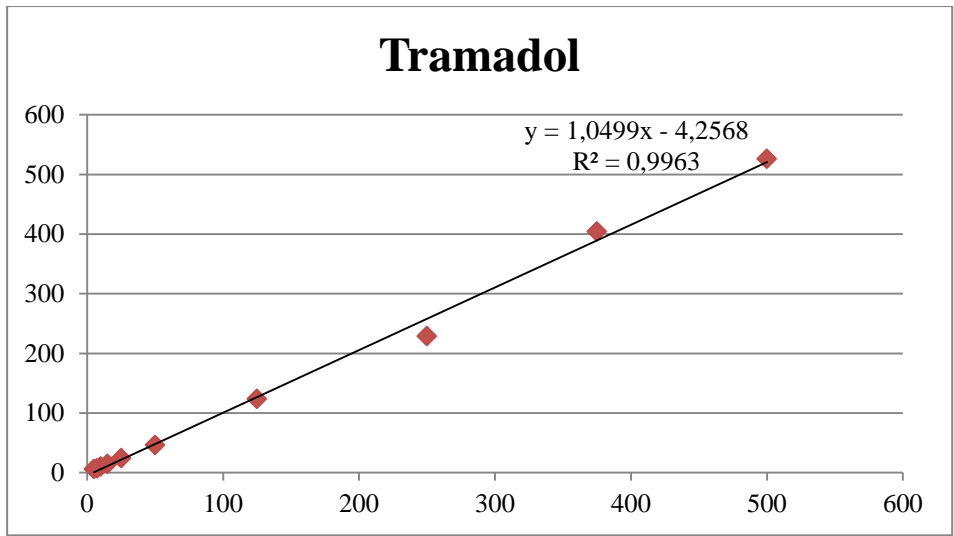
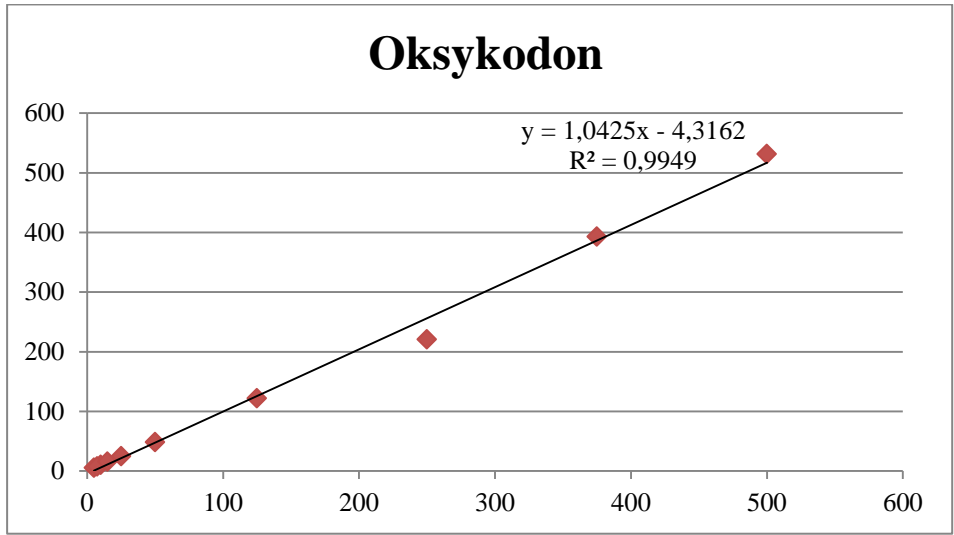
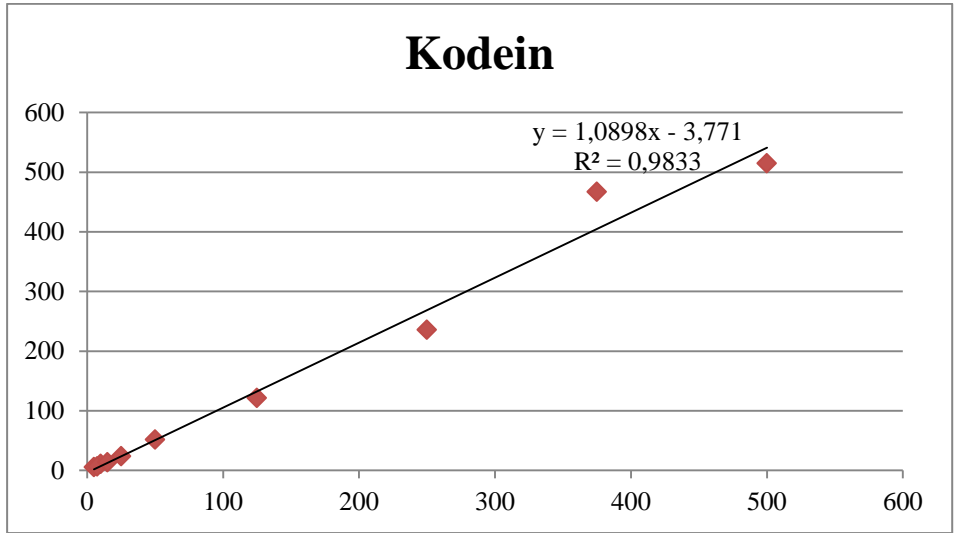


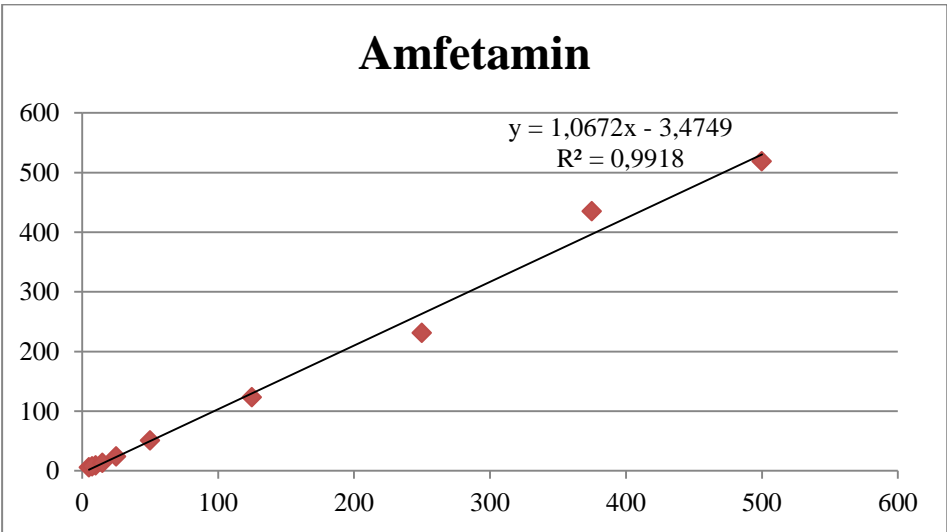
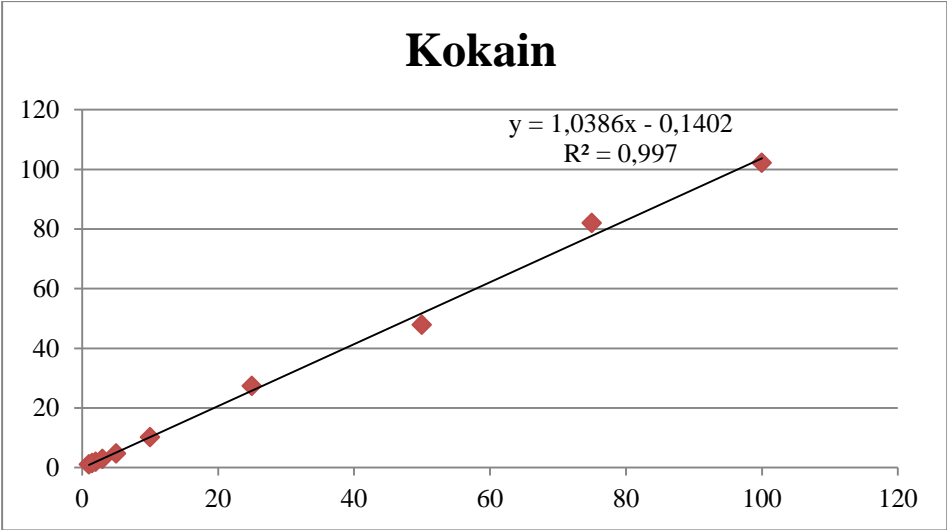
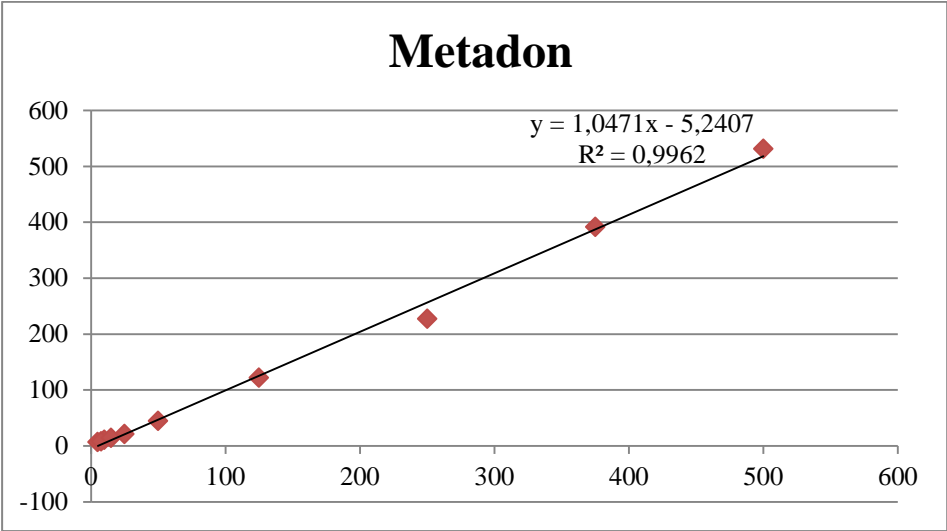
Vedlegg 4: Kalibreringskurver for forsøk 1

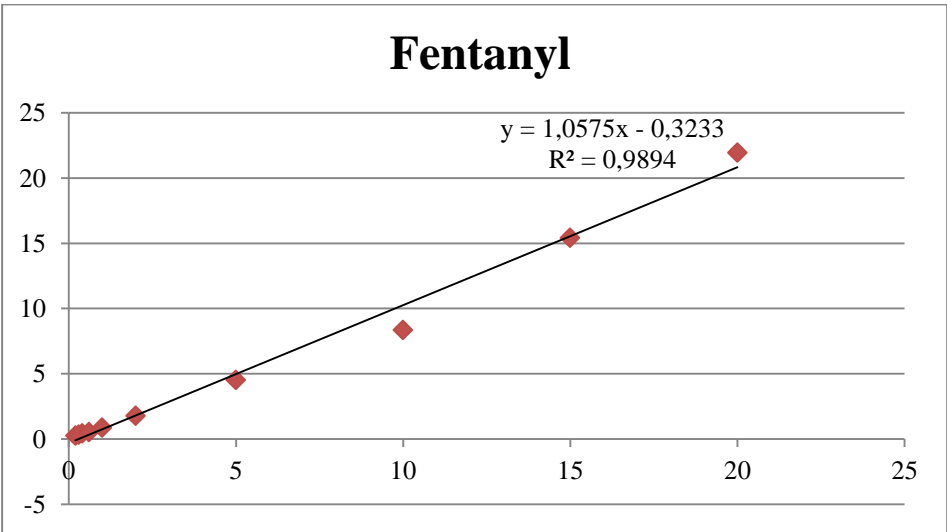
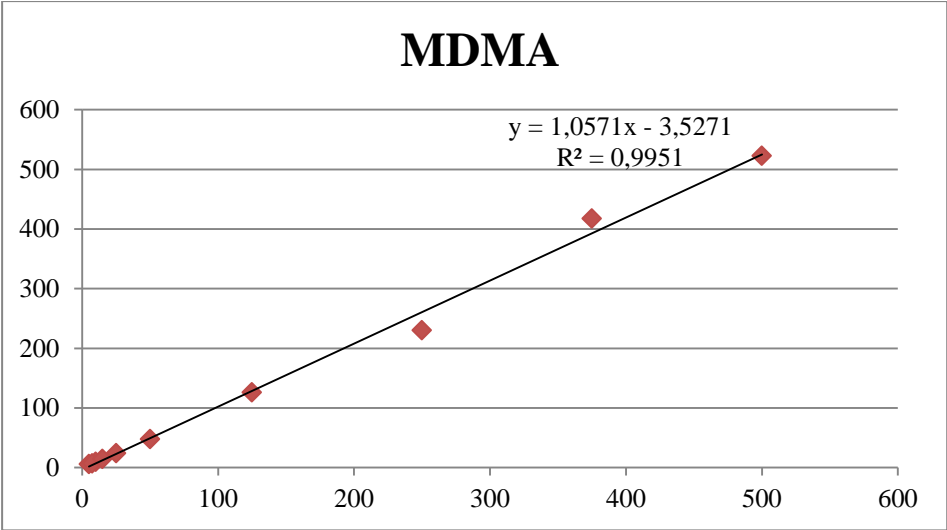
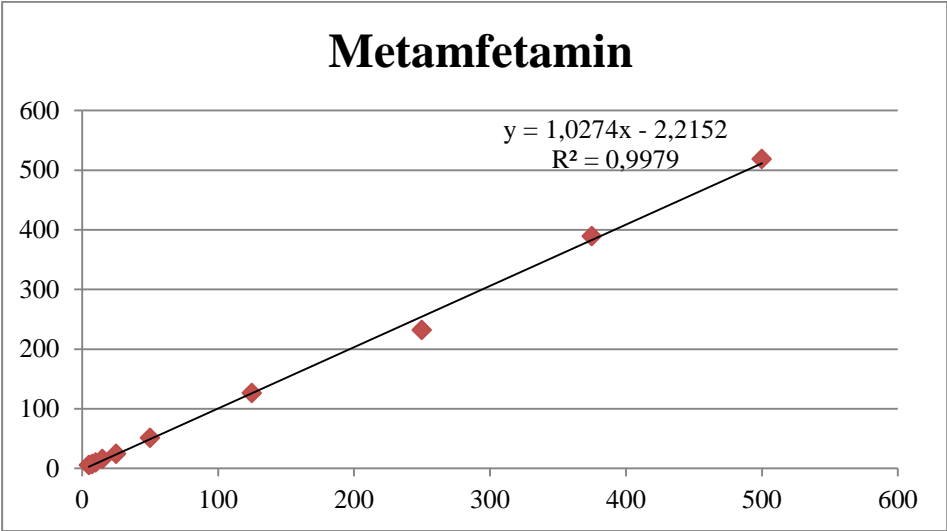












Vedlegg 5: Blandinger av stoffene brukt i selektivitetsforsøk

Blanding 1	
Stoff	Konsentrasjon i blod (μM)
Citalopram	2
Mirtazapin	2
Venlafaksin	2
Paroxetin	2
Sertralin	2
Fluoxetin	2
Duloxetin	8
Mianserin	2
Norttryptilin	2
Amitryptilin	2
Trimipramin	2
Klomipramin	2
Doxepin	2
Hydroksybupropion	2
Vareniklin	2
Haloperidol	0,3
Proklorperazin	1
Aripiprazol	1
Levomepromazin	2
Quetiapin	2
Klozapin	3

Blanding 2	
Stoff	Konsentrasjon i blod (μM)
Zuklopentixol	1
Risperidon	1
9-OH-risperidon	1
Olanzapin	2
Klorprotixen	2
Prometazin	3
Ketobemidon	1
O-desmetyltramadol	3
Petidin	8
Deksklorfeniramin	1
Alimemazin	1
Norpropoxyfen	8
Hydroksyzin	3
Lamotrigin	3
Karbamazepin	13
10-OH-karbamazepin	17

Gabapentin	33
------------	----

Blanding 3	
Stoff	Konsentrasjon i blod (μM)
Paracetamol	67
Fenazon	13
Klometiazol	83
Baklofen	17
Diltiazem	2
Metoprolol	8
Propranolol	8
7-aminoflunitrazepam	0
7-aminonitrazepam	2
7-aminoklonazepam	2

Blanding 4	
Stoff	Konsentrasjon i blod (μM)
Metaoxedrin	1
Homoamfetamin	1
Harmin	1
MDAI	1
Dimetyltryptamin	1
bk-MDDMA	1
Fenmetrazin	1
5-MeO-DMT	1
4-fluoroamfetamin	1
3-fluoramfetamin	1
4-fluormetamfetamin	1
bk-MBDB	1
N-OH-MDA	1
Salvinorin A	1
BDB	1
6-APB	1
MBDB	1
4-MEC	1
2,5-DMA	1
2C-C	1
2C-I	1
2C-T-2	1
2C-E	1
2C-T-7	1
2C-P	1
2-DPMP	1

3-MMC	1
3,4-CTMP	1
5-EAPD	1
MET	1
6-APDB	1
MDPV	1
mCPP	1
p-metyl-4-aminoreks	1
4-isopropylfenidat	1
Alfa-PVT	1
Difenidin	1
2-fluormetamfetamin	1
DOC	1
Nifoxipam	0,3
25C-NBOH	1
Alfa-PVP	1,0
Metaklonazepam	1
4F-PVP	1

Blanding 5	
Stoff	Konsentrasjon i blod (μM)
2-fluoramfetamin	1
4-metylamfetamin	1
Alfa-metyltryptamin	1
Desomorfin	1
Metoxetamin	1
Metylon	1
Etylkatinon	1
Bromo-Dragonfly	1
4-CMC	1
Pentedron	1
4-metylmfetamin	1
25I-NBOMe	1
25C-NBOMe	1
Dimetokain	1
DOI	1
4-metyltioamfetamin	1
5-IT	1
Xylazin	1
Etylfenidat	1
4-fluormetamfetamin	1
AH-7921	1
N,N-dimetyl-MDA	1
2-MMC	1

Tapentadol	1
Metiopropamin	1
Carfentanyl	1
2-AI	1
5-APB	1
2C-B	1
MT45	1
DMAA	1
3-MeO-PCP	1
5-MeO-DIPT	1
25B-NBOMe	1
Ibogain	1
bk-MDEA	1
4-bromometkatinon	1
Deskloretizolam	1
3-fluormetamfetamin	1
Alfa-PHP	1
4-OH-MET	1
Dimetokain	1
Camfetamin	1
25H-NBOMe	1
PV8	1
PV9	1
25G-NBOMe	0,3
Alfa-PBP	0,3
3F-fenmetrazin	0,3
4-AcO-DIPT	0,3
4-kloramfetamin	1

Vedlegg 6: Poster presentert på kromatografisymposiet 2018



UiO **Farmasøytisk institutt**
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet



Bestemmelse av rusmidler i blod basert på Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS), Parallell Artificial Membrane Extraction (PALME) og UHPLC-MS/MS

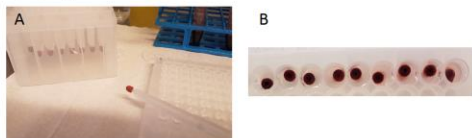
Ingrid Oksavik Mestad¹, Elisabeth Leere Øiestad^{1, 2}, Stig Pedersen- Bjergaard¹, Astrid Gjelstad¹.

¹ Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Oslo, Norge.

² Avdeling for rettsmedisinske fag, Oslo universitetssykehus, Oslo, Norge.

Bakgrunn

- Ruspåvirket kjøring kan føre til trafikulykker, skader og dødsfall. De siste tiårene har særlig lav- og middelsinntsstand sett en økning i antallet alvorlige trafikulykker, og 90% av dødsulykker i trafikken skjer i slike land. WHO estimerer at trafikulykker kan være den femte mest vanlige dødsårsaken innen 2030. For å få innakt i hvilke stoffer som er vanlige i veitrafikken kan man analysere prøver fra tilfeldig utpukkede bilførere. Tradisjonelle blodprøver krever trent helsepersonell for prøvetaking og temperaturkontrollert transport og oppbevaring, og er derfor lite egnet for å undersøke bruk av narkotika og legemidler blant tilfeldig bilførere, eller i andre kohorter av tilfeldig utvalgte personer.
- Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) er en alternativ metode for prøvetaking av blodprøver. Med denne metoden samler man opp for eksempel 20 µl blod med en liten "prøvesvamp" som absorberer nøyaktig volum. Prøvene blir tørket ved romtemperatur og deretter sendt til laboratoriet for analyse. På denne måten unngår man ulempene knyttet til de tradisjonelle blodprøvene. Slike prøver kan være særlig aktuelle for forsendelse av prøver fra lav- og middelsinntsstand til Norge for analyse.
- Det er ønskelig med en effektiv metode for analyse av slike prøver uten forutgående eluering. Med ekstraksjonsmetoden Parallell Artificial Membrane Extraction (PALME) kan «svampene» puttes direkte i en 96-brønnsplate og ekstraheres.



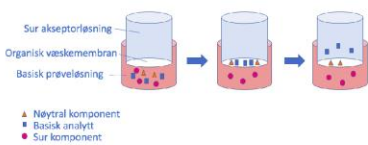
Figur 1: A. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS). B. En rad med VAMS-tipper (svamper) i 96-brønnsplaten.

- Prøveopparbeidelsen gjøres ved PALME, som baserer seg på prinsippene for væske-væske ekstraksjon (LLE). Ekstraksjonsteknikken er utviklet på seksjon for farmasøytisk kjemi, Universitetet i Oslo. Teknikken utføres i et 96-brønns format, og er et trefase-system hvor analytten ekstraheres fra vandige prøver i en donorbrønn, over en organisk væskemembran, og til en vandig akseptorløsning. Fordele med teknikken er lavt løsemiddelforbruk, gode muligheter for oppkonsentrering og mulighet for automatisering (Gjelstad, Andresen et al. 2017). Analysemetoden vil være basert på væskrokromatografi koblet med tandem massespektrometri (LC-MS/MS).



Figur 2: Parallell Artificial Membrane Extraction (PALME) oppsett. Venstre: Donorplate, akseptorplate med organisk væskemembran, og et lokk for å hindre fordampning. Høyre: Oversikt over ekstraksjonsoppsettet i hver enkelt brønn.

- Separasjonen av analytt og komponenter i prøveløsningen baseres på en pH-gradient. pH-gradienten dannes ved å justere pH i prøveløsningen, og akseptorløsningen. Ved ekstraksjon av basiske analytter justeres prøveløsningen til en basisk pH, og akseptorløsningen til en sur pH. Basisk analytt og nøytrale komponenter vil løse seg i den organiske væskemembranen, mens sure komponenter vil være ladet, og forbli i den vandige prøveløsningen. De basiske analyttene vil videre løse seg i ionisert form i den sure akseptorløsningen, mens de nøytrale komponentene blir igjen i den organiske væskemembranen. Ekstraksjonsprinsippet er illustrert i figur 3.



Figur 3: Ekstraksjonsprosessen i PALME

Problemstilling

I dette prosjektet arbeides det med å utvikle en analysemetode for rusmidler i blod der VAMS er brukt for prøvetaking og prøveopparbeidelsen gjøres ved PALME.

Metode

- Syten rusmidler (tabell 2) ble inkludert i prosjektet. Betingelsene for ekstraksjonen er tidligere brukt for ekstraksjon av benzodiazepiner (Wong, G., 2017)
- VAMS som prøvetakingsmetode ble sammenlignet med 20 µl blod pipettert direkte i PALME-platen.
- En Waters Acquity UHPLC (USA) ble brukt for kromatografisk separasjon. Gradienteluering ble utført på kolonnen Kinetex® Biphenyl (100 x 2.1 mm indre diameter) med partikkelstørrelse 1,7µm og en porøstørrelse på 100 Å, fra Phenomenex (USA). Gradienteluering ble gjort med metanol og 10 mM ammonium format buffer pH 3,1 som mobilfase. Kolonnertemperaturen var satt til 60 °C. ESI-MS/MS deteksjon ble utført på et TQS tandem massepektrometer, fra Waters. Deteksjonen ble utført med elektrospionisasjon (ESI) i multiple reaction monitoring (MRM) modus ved hjelp av positiv ionisering. Ekstraksjonen med PALME ble utført med betingelsene gitt i tabell 1.

Referanser:

Gjelstad, A., et al. (2017). "High-throughput liquid-liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction." *LC-GC North America* 39(1): 192-196.
Wong, G. (2017). "Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) analyse av basiske upolare substanser og benzodiazepiner" [masteroppgave ved universitetet i Oslo]

Tabell 1: Betingelser for ekstraksjon i PALME.

Prøveløsning	Betingelser	Volum (µl)
Akseptorløsning	Standard i karbonatbuffer (pH=9,3)	225
Organisk væskemembran	DMSO:200 mM HCOOH (72:25)	150
Ekstraksjonstid	Undecanonidihexyleter (11:1) + 1% triocetylamin	4
Etter ekstraksjon	60 min	
	100 µl ekstrakt fra akseptorbrønn, fortynnes med 100 µl Milli-Q vann	

Resultater

- Standardkurver basert på ekstraherte VAMS med lineær kurvetilpassing og vektning 1/x ble vurdert basert på R², tabell 2. Proesseffektiviteten for VAMS sammenliknet med direkte ekstraksjon av 20 µl blod er vist i tabell 3. Proesseffektivitet, PE, defineres som:

$$PE = \frac{\text{Respons av analytt i ekstrakt}}{\text{Respons av analytt tilsatt i ren løsning}} \cdot 100\%$$

Tabell 2: Stoffklasse, standardområdet for ekstraksjonen og linearitet ved ekstraksjon av standarder samlet med VAMS

Komponent	Stoffklasse	Standardområde (µM)	R ²
Alprazolam	Benzodiazepin	0,010-0,254	0,994
Diazepam	Benzodiazepin	0,020-0,506	0,999
Flunitrazepam	Benzodiazepin	0,005-0,127	0,996
Klonazepam	Benzodiazepin	0,004-0,100	0,992
Nitrazepam	Benzodiazepin	0,020-0,505	0,982
Oxazepam	Benzodiazepin	0,049-1,259	0,997
Zopiklon	Benzodiazepinlignende	0,020-0,502	0,996
Zolpidem	Benzodiazepinlignende	0,020-0,504	0,997
Morfin	Opioid	0,020-0,506	0,989
Kodein	Opioid	0,020-0,508	0,994
Oksykodon	Opioid	0,020-0,503	0,995
Tramadol	Opioid	0,020-0,507	0,998
Metadon	Opioid	0,019-0,500	0,995
Kokain	Sentralstimulerende rusmiddel	0,005-0,126	0,997
Amfetamin	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020-0,503	0,993
Metamfetamin	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020-0,504	0,999
MDMA	Sentralstimulerende rusmiddel	0,020-0,505	0,999

Tabell 3: pKa verdier og Log P verdier for rusmidlene og proesseffektivitet til stoffene (n=6) fra fullblod, hvor VAMS som prøvetakingsmetode er sammenlignet med blod pipettert direkte i PALME-platen.

Komponent	Basisk pKa	Log P	VAMS Proesseffektivitet (RSD) i %	Bloddråpe Proesseffektivitet (RSD) i %
Alprazolam	5,0	3,0	77(13)	70(5)
Diazepam	2,9	3,1	82(10)	80(1)
Flunitrazepam	1,7	2,6	98(13)	93(5)
Klonazepam	1,6	2,5	102(16)	97(6)
Nitrazepam	2,7	2,6	92(18)	88(11)
Oxazepam	-1,5	2,9	99(11)	94(2)
Zopiklon	6,7	2,7	47(16)	32(26)
Zolpidem	5,4	3,0	92(9)	89(1)
Morfin	9,1	0,9	12(16)	11(12)
Kodein	9,2	1,3	45(14)	44(6)
Oksykodon	7,6	1,6	105(11)	104(6)
Tramadol	9,6	2,3	120(14)	107(11)
Metadon	9,1	3,9	93(19)	103(3)
Kokain	9,0	2,3	119(12)	94(14)
Amfetamin	10,1	1,8	43(10)	42(11)
Metamfetamin	10,4	2,2	67(14)	65(3)
MDMA	10,1	1,9	64(10)	63(3)

- Man kan se at resultatene presentert i tabell 2, at lineariteten ved ekstraksjon av standarder samlet med VAMS stort sett er god, men med noen unntak. Stoffene har varierende proesseffektivitet (tabell 3). Betingelsene for ekstraksjonen kan arbeides mer med for å muliggjøre oppnå bedre proesseffektivitet for noen av stoffene. For standarder samlet med VAMS var det noe større variasjon enn hvor blod ble pipettert direkte i PALME-platen.

Konklusjon

Man ser at det er mulig å ekstrahere blodprøver fra VAMS direkte i PALME-platen. Variasjonen i ekstraksjonen var noe større der VAMS er brukt som sampling metode. Det er planlagt å arbeide videre med problemstillingen, og å se på om grunnen kan være at VAMS ikke samler nøyaktig 20 µl blod, eller om man bør innføre en bestemt teknikk for å samle nøyaktig volum. Det arbeides med å inkludere THC i metoden, da det foreligger har vært vanskelig å få til.

Kontakt for spørsmål: ingridmestad@gmail.com