

**Miniatyrisering av terapeutisk legemiddel-
monitorering av psykofarmaka basert på
Volumetric Absorptive Microsampling og
*Parallel artificial liquid membrane extraction***

My Hoai Thi Truong



Masteroppgave i Farmasi
45 studiepoeng

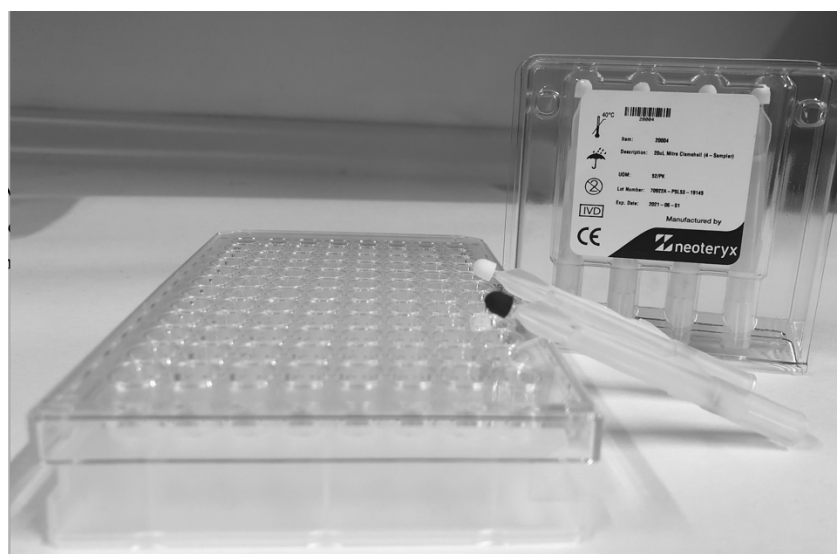
Seksjon for farmasøytisk kjemi
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelig fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2020

Miniatyrisering av terapeutisk legemiddel- monitorering av psykofarmaka basert på *Volumetric Absorptive Microsampling* og *Parallel artificial liquid membrane extraction*

Masteroppgaven ble gjennomført i perioden august 2019-mai 2020 ved Faggruppe for Legemiddelanalyse, Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo



Veiledere:

Elisabeth Leere Øiestad

Førsteamanuensis, 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

Marthe Lid

Kvalitetskontrollingeniør, Norsk medisinsk syklotronsenter AS

© My Hoai Thi Truong

2020

**Miniatyrisering av terapeutisk legemiddelmonitorering av psykofarmaka basert på
*Volumetric Absorptive Microsampling og Parallell artificial liquid membrane extraction***

My Hoai Thi Truong

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Sammendrag

Psykofarmaka omfatter antipsykotika, antidepressiva, anxiolytika (angstdempende legemidler), sedativa (beroligende legemidler) og hypnotika (sovemidler). Det er vanskelig å vurdere effekt av psykofarmaka, og behandlingen krever individuell dosetilpasning på grunn av individuelle og farmakokinetiske forskjeller mellom pasienter. Det er derfor relevant å utføre terapeutisk legemiddelmonitorering (*therapeutic drug monitoring*, TDM) av psykofarmaka ved medisinsk behandling av psykiske lidelser.

Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) ble introdusert i 2013 og er et nytt konsept for væskefase-mikroekstraksjon (*liquid-phase micro extraction*). PALME-oppsettet består av en 96-brønns donorplate, en 96-brønns akseptorplate med filter på bunnen av hver brønn og en forseglingsfilm laget av aluminium. Dette utgjør et trefasesystem. Analyttene ekstraheres fra vandig prøveløsning i donorbrønningen, over en organisk væskemembran, og videre til en vandig akseptorløsning. pH i prøveløsningen og akseptorløsningen justeres slik at det dannes en pH-gradient som fremmer diffusjon av analyttene mellom fasene.

Bruk av *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS) ble første gang beskrevet i 2014 som en alternativ metode for prøvetaking av blodprøver for kvantitativ bioanalyse. En VAMS har en absorberende, porøs hydrofil tipp som er festet til et plathåndtak, denne «prøvesvampen» absorberer et nøyaktig volum på enten 10 eller 20 µl uavhengig av hematokrit-nivå og homogenitet. Blod samles inn fra et stikk i finger som innebærer at prøver kan også tas hjemme og ikke må tas av helsepersonell på laboratorier.

I dette arbeidet ble mikroekstraksjonsmetoden PALME kombinert med prøvetakingsmetoden VAMS for et utvalg av psykofarmaka og deres metabolitter til formålet terapeutisk legemiddelmonitorering. Totalt ble syv psykofarmaka og fire metabolitter testet: amitriptylin, aripiprazol, dehydroaripiprazol, desmetylcitalopram, escitalopram, klorprotiksen, kvetiapin, n-desalkylkvetiapin, nortriptylin, o-desmetylvenlafaksin og venlafaksin. Substansene var basiske aminer med pKa-verdi mellom 7,46 og 10,54 og log P-verdi mellom 2,72 og 5,07.

Hensikten med oppgaven var å utvikle en effektiv metode for PALME-ekstraksjon av psykofarmaka fra VAMS slik at metoden kunne benyttes til kvantitativ analyse for TDM. Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger og fullblodprøver absorbert i VAMS ble undersøkt.

Flere ekstraksjonsparametere ble optimalisert i arbeidet; Ulike donorløsninger, organisk væskemembran, akseptorløsninger og ekstraksjonstider ble testet. For optimalisering av VAMS som prøvetakingsmetode, ble ulike måter å inkorporere internstandard (IS) i VAMS og ulike løsemidler for internstandarder testet. I tillegg ble VAMS fra blod med antikoagulant, EDTA-blod, og VAMS fra ikke EDTA blod (blod fra serumrør uten tilsetning) sammenlignet med hensyn på ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt.

Den endelige prosedyren for kombinasjonen av PALME og VAMS besto av blodprøvetaking med VAMS (20 μ l) som ble tørket i minst tre timer. Deretter ble internstandard tilsatt til tippen av VAMS, og VAMS ble tørket i nye tre timer. Tørket VAMS ble overført til donorbrønnen. Donorløsningen bestod av 200 μ l 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer og 25 μ l dimetylsulfoksid (DMSO). Det totale løsningsvolumet i donorbrønnen var 225 μ l. Organisk væskemembran bestod av 3 μ l dodecylacetat (DDA) + 10 % trioktylammin (TOA) og akseptorløsning var 50 μ l 20 mM maursyre. Ekstraksjonstiden var 60 minutter, og ristehastighet på 900 rpm fremmet ekstraksjonen av stoffene. Ekstraktet ble analysert ved *ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry* (UHPLC-MS/MS).

Metodevalidering ble utført ved å evaluere nøyaktighet og presisjon, minste detekterbare konsentrasjon (MDK), minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), overdrag, linearitet, ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt, hematokrit-effekt og spesifisitet. Ekstraksjonsmetoden viste en god spesifisitet og overdragstesten oppfylte kravet. Standardkurvene hadde R²-verdier mellom 0,97-0,99, hvor noen standardkurver hadde kvadratisk tilpasning. Deteksjonsgrensen ble satt mellom 0,25-10 ng/ml. Minste kvantifiserbare konsentrasjon var mellom 12-300 ng/ml som var innenfor referansesområdet for de fleste stoffene, bortsett fra escitalopram. Testen for hematokrit-effekt viste at det var variasjon i utbytte og matrikseffekt mellom de ulike hematokrit-nivåer. Metoden hadde god presisjon, men noe dårligere nøyaktighet. Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt var ansett akseptable ved lavt konsentrasjonsnivå, men ikke ved høyt konsentrasjonsnivå. Ekstraksjonsutbytte for stoffene fra VAMS var lavere enn fra fullblodprøve uten VAMS. Til slutt ble 20 reelle pasientprøver absorbert i VAMS analysert med metoden, og resultatet ble sammenlignet med resultater fra referanselaboratoriet «Senter for Psykofarmakologi» ved Diakonhjemmet sykehus. Resultatene for de reelle prøvene viste god overensstemmelse i hvilke stoffer som ble funnet, men avvik i målt konsentrasjon, særlig for escitalopram og metabolitten. Det ble målt

lavere konsentrasjoner i VAMS-prøver fra samme pasient som ble analyserte en og fire uker etter første analyse.

Kombinasjonen av PALME og VAMS forenklet arbeidstrinnene, ved at VAMS kan overføres rett til donorbrønn slik at frigjøring av analytt fra VAMS og ekstraksjon av analytt gjennom væskemembranen utføres i ett enkelt steg. Kombinasjonen viste lovende resultater for ekstraksjon av psykofarmaka, og den optimale metoden kan legge grunnlaget for effektive prøveoppbevaringsmetoder i videre arbeid. Resultater fra metodevalidering og analyse av reelle prøver har vist at noe arbeid må gjøres for at metoden potensielt kan anvendes i et rutinelaboratorium. Det er fortsatt mange ekstraksjonsparametere i PALME systemet som bør testes for å tilpasse flere psykofarmaka og for å kunne bruke systemet til TDM av psykofarmaka.

Forord

I forbindelse med denne oppgaven vil jeg rette en stor takk til mine veiledere for en meget god veiledning, oppfølging og hjelp på laboratoriet og med skriving. Takk til Stig Pedersen-Bjergaard som ga meg mulighet til å skrive masteroppgave i det fagområdet, legemiddelanalyse, som har inspirert meg mest i løpet av de fem årene på farmasistudiet. En stor takk til Elisabeth Leere Øiestad for all god hjelp, veiledning og oppfølging og gode faglige samtaler. Takk for at du alltid stilte opp når jeg trengte hjelp. Tusen takk for all forståelse, støtte og tålmodighet. Tusen takk til Astrid Gjelstad for gode tilbakemeldinger i oppgaveskriving. Tusen takk til Marthe Lid for god hjelp på lab og at du alltid stilte opp når jeg trengte hjelp. Takk til alle på Avdeling for lagemiddelanalyse for god hjelp på laben og et trivelig og trygt miljø. I tillegg vil jeg takke alle på Senter for psykofarmakologi for muligheten til å samarbeide i forbindelse med oppgaven.

Takk til min medstudenter som jeg har vært heldig å få dele kontor med det siste året: Kimmi, Thong, Jasna, Milena og Fadi. Takk for all hjelp, oppmuntring og morsomme samtaler. Jeg er veldig takknemlig for at jeg blir bedre kjent med dere.

Til sist; tusen takk til familien min som har støttet og motivert meg gjennom det siste året. Takk til min mann Hassan som har ordnet opp hjemme og med tvillingene. Takk for din tålmodighet og støtte du har gitt meg under studiet. Jeg er glad i deg og guttene, Arian og Elias.

Sarpsborg, mai 2020

My Truong

Innholdsfortegnelse

Forkortelser	1
1 Innledning.....	4
1.1 Bakgrunn	4
1.2 Hensikt	7
2 Teori	8
2.1 Terapikontroll av legemidler ved psykiske lidelser	8
2.1.1 Antipsykotika	9
2.1.2 Antidepressiva.....	11
2.1.3 Terapeutisk legemiddelmonitorering	13
2.2 Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS)	14
2.3 Fullblod som analysemedium.....	16
2.4 Prøveopparbeidelse	17
2.4.1 Væske-væske ekstraksjon (LLE)	18
2.4.2 Væske-væske mikroekstraksjon (LPME).....	20
2.4.3 Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME).....	22
2.5 Væsekromatografi	24
2.5.1 Omvendt-fasekromatografi	24
2.5.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	26
2.5.3 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC).....	26
2.6 Massespektrometri (MS)	28
2.6.1 Elektrosprayionisasjon	29
2.6.2 Lineær ionfelle	30
3 Eksperimentelt.....	32
3.1 Karakteristikk av analytter	32
3.2 Kjemikalier.....	35
3.3 Utstyr.....	37
3.4 Løsninger.....	38
3.4.1 Stamløsninger.....	38
3.4.2 Arbeidsløsning	39
3.4.3 Prøveløsninger.....	40
3.4.4 Eksternstandarder	40
3.4.5 Standarder til innledende forsøk i fullblod.....	41
3.4.6 Standarder og kontroller til metodevalidering	41
3.4.7 Internstandardløsninger.....	42

3.4.8	Fullblod	42
3.4.9	Diverse løsninger.....	43
	Donorløsning	43
3.4.10	Mobilfaser	44
3.5	Instrumentelle betingelser	44
3.5.1	Væskekromatografi (UHPLC betingelser).....	44
3.5.2	Massespektrometri (MS betingelser)	45
3.6	Utførelse av PALME.....	48
3.6.1	PALME fra vandige prøveløsinger	48
3.6.2	PALME fra fullblod og plasma.....	49
3.6.3	PALME fra VAMS, reelle prøver og metodevalidering	50
3.7	Innledende forsøk.....	50
3.7.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger	50
3.7.2	Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra fullblodprøver	51
3.8	Optimalisering av ekstraksjonsparametere til PALME fra VAMS.....	54
3.9	Metodevalidering	56
3.9.1	Presisjon og nøyaktighet	57
3.9.2	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK).....	58
3.9.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK).....	58
3.9.4	Overdrag.....	58
3.9.5	Linearitet	58
3.9.6	Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt.....	58
3.9.7	Hematokrit-effekt	59
3.9.8	Spesifisitet	60
3.10	Analyse av reelle prøver.....	61
4	Resultater og diskusjon	62
4.1	Innledende forsøk.....	62
4.1.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger	62
4.1.2	Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra prøveløsninger med fullblod... 64	
4.2	Optimalisering av PALME-ekstraksjon fra VAMS	73
4.3	Metodevalidering	82
4.3.1	Presisjon og nøyaktighet	83
4.3.2	Minste detekterbare konsentrasjon (MDK).....	87
4.3.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK).....	87
4.3.4	Overdrag.....	89
4.3.5	Linearitet	90
4.3.6	Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet, matrikseffekt.....	91

4.3.7	Hematokrit effekt	94
4.3.8	Spesifisitet	96
4.4	Analyse av reelle prøver.....	96
5	Konklusjon	101
	Litteraturliste	103
	Vedlegg	108

Forkortelser

5-HT ₂ -antagonister	serotonin reseptor 2 antagonister
Å	ångstrøm
µg	mikrogram
µl	mikroliter
µm	mikrometer
AGA	<i>second generation antipsychotics</i> / andregenerasjons antipsykotika
AGNP	<i>Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie</i>
APCI	atmospheric pressure chemical ionization/ atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon
APPI	atmospheric pressure photo-ionization/ atmosfæretrykk-foto-ionisering
AU	<i>astronomical Unit</i> / arbitrære enheter
CID	<i>collision induced dissociation</i> / kollisjon induisert energi
cm	centimeter
CYP	cytokrom-P 450
D2-reseptor	dopaminreseptor
Da	dalton
DBS	dried blood spots
DDA	dodecylacetat
DLLME	<i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>
DMSO	dimetylsulfoksid
EDTA-blod	blod med antikoagulant
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ESI	electrospray ionization / elektroprayionisasjon
FGA	<i>first generation antipsychotics</i> / førstegenerasjons antipsykotika

FI	Farmasøytisk institutt
GC	<i>gas chromatography</i> / gasskromatografi
H	høydeekvivalenten til en teoretisk plate
HF-LPME	<i>Hollow-fiber liquid phase microextraction</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> / væskekromatografi
kV	kilovolt
HT	hematokrit
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> / væske-kromatografi koblet med tandem massespektrometri
LLE	<i>liquid-liquid extraction</i> / væske-væske-ekstraksjon
LLLME	<i>liquid-liquid-liquid microextraction</i> / væske-væske-væske mikroekstraksjon
LPME	<i>liquid phase micro extraction</i> / Væske-væske mikroekstraksjon
M	molar
MAOIs	<i>monoamine oxidase inhibitors</i> / monoamin oksidase hemmere
MDK	minste detekterbare konsentrasjon
ME	matrikseffekt
MeOH	metanol
MKK	minste kvantifiserbare konsentrasjon
ml	milliliter
mg	milligram
min	minutter
mm	millimeter
mM	millimolar
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
m/z	masse-til-ladning-forhold
ng	nanogram

OUS	Oslo Universitetssykehus
PALME	<i>parallel artificial liquid membrane extraction</i>
PE	prosesseffektivitet
PP	polypropylen
PVDF	polyvinylidenfluorid
Rpm	<i>revolutions per minute</i> / omdreininger per minutt
RSD	<i>relative standard deviation</i> / relativt standardavvik
SDME	<i>single-drop liquid-phase microextraction</i>
SFP	Senter for psykofarmakologi
SLM	<i>supported liquid membrane</i> / organiske væske membran
SNRI	<i>serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors</i> / Serotonin-noradrenalinreopptakshemmene
SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> / Selektive serotoninreopptakshemmere
SPE	<i>solid-phase extraction</i> /fast-fase-ekstraksjon
SRM	<i>single reaction monitoring</i>
S/N	signal-til-støy-forhold
TCA	<i>tricyclic antidepressants</i> / tricykliske antidepressiva
TDM	<i>therapeutic drug monitoring</i> / terapeutisk legemiddelmonitorering
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> / trifluoreddiksyre
TLC	<i>thin-layer chromatography</i> / tynnsjikt-kromatografi
TOA	trioktylamin
VAMS	<i>volumetric absorptive microsampling</i> / <i>volumetric absorptive micro sampler</i> (VAMS brukes I denne opppgaven om begge deler)
v/v	<i>volume to volume ratio</i> / blandingsforhold i volum
UHPLC	<i>Ultrahigh-pressure liquid chromatography</i>
UHPLC-MS/MS	<i>Ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
w/w	<i>weight to weight ratio</i> / blandingsforhold i vekt

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Psykofarmaka omfatter antipsykotika, antidepressiva, anxiolytika (angstdempende legemidler), sedativa (beroligende legemidler) og hypnotika (sovemidler). Disse legemiddel-gruppene virker hovedsakelig på psykiske funksjoner og anvendes i behandling av psykiske lidelser [1]. Psykiske lidelser er svært vanlig i den norske befolkningen. Omtrent halvparten av voksne rammes av en psykisk lidelse i løpet av livet, mens 8 % av barn og unge har en diagnostiserbar psykisk lidelse [2]. Forbruket av psykofarmaka i Norge har økt de siste årene. Spesielt er det stor økning i bruk av antidepressiva [3, 4]. Generelt kan det være vanskelig å vurdere effekt av psykofarmaka, og behandlingen krever individuell dosetilpasning. Dermed er det relevant å utføre terapeutisk legemiddelmonitorering (*therapeutic drug monitoring*, TDM) av psykofarmaka ved medisinsk behandling av psykiske lidelser. Det er individuelle og farmakokinetiske forskjeller mellom pasienter. Dette skyldes blant annet alder, genetiske polymorfismer og samtidige sykdommer. Andre indikasjoner for TDM i behandlingen er å undersøke pasientenes etterlevelse av legemiddelbruken og risiko for legemiddelinteraksjoner. TDM er vesentlig aktuelt i behandling av blant annet barn, eldre, gravide, hos pasienter som benytter flere legemidler samtidig, pasienter med mutasjon i CYP-enzymmer og pasienter som har mange sykdommer samtidig [5].

Pasienter må vanligvis oppsøke prøvetakingsenheter eller laboratorier, etter henvisning fra legen, for blodprøvetaking. Serum og plasma benyttes ofte som prøvematerialer i TDM [5, 6]. Det er mange ulemper ved plasma- og serumprøver, blant annet mengde tappevolum som er nødvendig for å få tilstrekkelig volum av serum eller plasma. Blodprøvene må først konverteres enten til serum eller plasma før analyse eller frysing. For å hindre degradering må prøvene oppbevares kaldt enten i kjøleskap ved korttidslagring eller i fryseboks ved langtidslagring. I tillegg er det viktig at prøvene beskyttes mot lys og oksygen for å unngå degradering [5, 6]. På grunn av utfordringer med opparbeidelse av serum og plasma og oppbevaring av blodprøvene ble en annen metode for prøvetaking utviklet. En nordmann, Ivar Christian Bang var den første som beskrev *Dried blood spots* (DBS) og som tok DBS i bruk for å undersøke glukosenivå i blod [7]. DBS ble introdusert for screening av metabolske sykdommer hos nyfødte av Dr. Robert Guthrie i 1963 [8]. I tillegg har DBS blitt brukt ved TDM og ved toksikologiske undersøkelser, blant annet epidemiologi, toksikokinetikk, miljøtoksikologi og rettstoksikologi. Denne

metoden tillater oppsamling av små volum av fullblod på et spesiallaget filtrerpapir. En DBS-prøve har mange fordeler sammenlignet med den konvensjonelle plasma- eller serumprøven, blant annet enkel prøvetaking, lite tappevolum og enklere transport og oppbevaring [9, 10]. Utfordringer ved DBS er dårlig kontroll på blodvolumet som appliseres på kortet og spredning av blod på filtrerpapiret, på grunn av hematokrit-effekten. Hematokrit er andelen av røde blodceller i et gitt blodvolum og er oppgitt i prosent. Hematokrit påvirker blodets viskositet. Dette gir opphav til forskjellige spredning av blod i filtrerpapiret slik at analyttkonsentrasjon kan bli påvirket [11].

Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) er en ny variant av DBS som forsøker å overkomme disse utfordringene. I denne oppgaven vil VAMS også bli brukt som forkortelse for en enkelt oppsamlingsenhet. I likhet med DBS kan man samle opp et volum, for eksempel 10 µl blod på tippen av en VAMS som deretter tørkes. Tippet til VAMS er laget av et absorberende polymerisk materiale som kan ta opp et blodvolum ved hjelp av kapillærkrefter [11]. Fordelen med VAMS er at «prøvesvampen» absorberer et nøyaktig volum på enten 10 eller 20 µl uavhengig av hematokrit-nivå og homogenitet, og hele «prøvesvampen» kan overføres direkte til donorbrønningen og ekstraheres uten videre arbeidstrinn. Blod samles inn fra et stikk i fingeren som innebærer at prøver også kan tas hjemme uten hjelp av autorisert helsepersonell [9, 12].

Fullblodprøver i TDM analyseres ofte enten ved væskekromatografi (HPLC) eller gaskromatografi (GC) [5, 6]. Væskekromatografi koblet til tandem massespektrometri (LC-MS/MS) metoder, som har høy sensitivitet og spesifisitet, kan anvendes til analyse av de fleste psykofarmaka og deres metabolitter [5]. Mange legemidler metaboliseres til aktive metabolitter som har betydning for farmakologisk effekt i kroppen [13]. Derfor er det vesentlig å inkludere måling av metabolitter ved TDM. Fullblod inneholder blant annet blodceller, proteiner og lipider som vil forurense og tette kolonnen i LC-MS/MS systemet. I tillegg inneholder fullblod andre komponenter som kan eluere med samme retensjonstid som analytt. Dette fører til at signalintensiteten med analytten kan bli forstyrret i form av forsterkelse eller undertrykkelse. Analytter er ofte til stede i for lave konsentrasjoner i biologiske matriser til at analysesystemet kan detektere dem uten oppkonsentrering. Dermed er prøveoppbevaring ofte nødvendig før analyse. Prøveoppbevaringen skal sikre at forurensninger blir fjernet fra prøven, at prøven er kompatibel med analyseinstrumentet og at analytten har en tilstrekkelig konsentrasjon for kvantitativ bestemmelse [6, 14].

De mest anvendte prøveopparbeidelsesmetodene innen bioanalyse er væske-væske-ekstraksjon (*Liquid-liquid extraction*, LLE), fast-fase-ekstraksjon (*Solid-phase extraction*, SPE) og proteinfelling [14]. Prøveopparbeidelsesmetodene består ofte av mange trinn og er da tids- og arbeidskrevende og blir sett på som det hastighetsbestemmende trinn i bioanalyse. Prøveopparbeidelsen er beregnet å ha en gjennomsnittlig tidsbruk på 61 % av den totale analysetiden, og den utgjør 30 % av feilkilder generert under kromatografisk analyse [15]. Det er derfor ønskelig å effektivisere og forenkle de tradisjonelle metodene. Væske-væske-ekstraksjon er en av de tradisjonelle prøveopparbeidelsesmetodene der ekstraksjonen er basert på fordeling av stoffer mellom to ulike faser. Stoffene er fordelt mellom en vandig og en organisk fase. LLE-metoden anvendes mye innen bioanalyse av legemidler. utfordringer ved å benytte LLE er at det er høyt forbruk av organiske løsemidler, metoden er tidkrevende og vanskelig å automatisere og organiske løsemidler må fjernes ved inndamping før rekonstituering og injeksjon i LC-MS/MS systemet [14].

Single-drop liquid-phase microextraction (SDME) og væske-fase mikroekstraksjonssystemer med hulfiber-teknikken (*Hollow-fiber liquid phase microextraction*, HF-LPME) er eksempler på miniatyrisering av LLE. Fordeler med disse metodene er at forbruk av organiske løsemiddel reduseres og det er høy grad av oppkonsentrering [16, 17]. I HF-LPME anvendes det et trefasesystem, hvor analytter ekstraheres fra en vandig prøve til organisk løsemiddel immobilisert i porene av en hulfiber, og videre over i en akseptorløsning som er kompatibel med LC-MS/MS. Dette betyr at det ikke er nødvendig å fordampe løsemiddel før analyse. Teknikken gir bedre fleksibilitet, LC-MS-kompatibilitet, og rene ekstrakter. Likevel er det en utfordring å implementere disse teknikkene i et multibrønn format [18].

I 2013 publiserte Gjelstad, Pedersen-Bjergaard og Rasmussen en modifisert utgave av HF-LPME, *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME), hvor hulfiberen i HF-LPME ble erstattet med flate membraner av polypropylen. Teknikken var utviklet basert på prinsippene for LLE. PALME er utført i et 96-brønnsformat bestående av et trefasesystem hvor analyttene ekstraheres fra vandig prøveløsning i en donorbrønn, over en organisk væskemembran, og til en vandig akseptorløsning i en akseptorbrønn. Ekstrakter kan injiseres direkte i LC/MS-instrumentet. pH i donorbrønnen og akseptorbrønnen justeres slik at analyttene ble ekstrahert fra donorbrønnen, over til væskemembran og videre til vandig fase i akseptorbrønnen [18].

Kombinasjonen av miniaturisert prøvetaking med VAMS og prøveopparbeidelse med mikroekstraksjonsmetoden PALME vil kunne gi effektiv kvantitativ analyse av et utvalg av psykofarmaka for TDM i behandling av psykiske lidelser. Prøvene kan tas hjemme og sendes til laboratoriet for fjerning av forurensinger og oppkonsentrering ved bruk av PALME. Arbeidet kan utføres i få trinn og kan delvis automatiseres. Bruk av 96-brønnsformatet muliggjør effektivisering da opptil 96 prøver kan opparbeides samtidig i ett trinn. I tillegg er forbruk av organiske løsemidler svært lite, noe som gjør PALME til en miljøvennlig prøveopparbeidelsesmetode [18].

1.2 Hensikt

Hensikten med denne oppgaven var å «miniaturisere TDM» av et utvalg psykofarmaka ved å kombinere miniaturisert prøvetaking og mikroekstraksjon før LC-MS/MS analyse. Følgende psykofarmaka ble inkludert: aripiprazol, amitriptylin, escitalopram, kvetiapin og kloproktiksen. Aktive metabolitter til flertallet av legemidlene ble også inkludert i metodevalideringen: dehydroaripiprazol, nortriptylin, desmetylcitalopram, n-desalkylkvetapin og o-desmetylvenlafaksin.

Punktvis fremstilling av hensikten med arbeidet:

- Utvikling og optimalisering av en LC-MS/MS metode for kvantitativ analyse av analyttene
- Optimalisering av ekstraksjonsparametere for PALME fra vandig prøver og fullblod
- Optimalisering av ekstraksjonsparametere for PALME fra VAMS prøver
- Validering av metoden
- Analyse av reelle prøver for sammenlikning med referanselaboratorium og for å studere holdbarhet av VAMS
- Vurdering av metoden for bruk innen TDM

2 Teori

2.1 Terapikontroll av legemidler ved psykiske lidelser

Psykiske lidelser betegner sykdommer og tilstander som påvirker tanker og følelser [19]. I Norge er depressive lidelser, angstlidelser og alkoholmisbruk de tre vanligste gruppene psykiske lidelser [2, 19]. Andre lidelser som schizofreni, psykose, demens og spiseforstyrrelse går også under samlebetegnelsen psykiske lidelser. Psykiske lidelser er svært vanlig i den norske befolkningen og forekomsten av psykiske lidelser er stabil. Omtrent halvparten av den voksne norske befolkningen vil bli plaget av en psykisk lidelse i løpet av livet, og omtrent 30 % av ungdom vil oppfylle de diagnostiske kriteriene for en psykisk lidelse i løpet av barneårene. Kvinner opplever oftere angst, depresjoner og spiseforstyrrelser, mens hos menn er rusrelaterte lidelser vanligere [2]. Psykiske lidelser er forårsaket av arv, miljøfaktorer og sykdommer eller skader i hjerne og sentralnervesystemet. Personen som blir rammet opplever ofte nedsatt funksjonsevne i dagliglivet og ubehag som reduserer livskvaliteten [19]. For den voksne delen av befolkningen er sykefravær, arbeidsuførhet og dødelighet alvorlige konsekvenser av psykiske lidelser [2]. De to viktigste behandlingsformene av psykiske lidelser er samtalebehandling (psykoterapi) og medikamentell behandling (psykofarmaka).

Psykofarmaka er en fellesbetegnelse for legemidler som påvirker psykiske funksjoner og brukes i behandling av psykiske lidelser. Gjennom årtusener har belladonna og opium vært brukt i behandlingen av psykiske lidelser. Moderne psykofarmaka kom på begynnelsen av 1950-tallet, hvor klorpromazin (antipsykotika) ble introdusert. Senere kom flere antidepressiva (tricykliske antidepressiva, TCA). I 1990-årene kom en rekke nye psykofarmaka som har samme effekt som de gamle, men med mindre bivirkninger. Antipsykotika, antidepressiva, anxiolytika og hypnotika er fire legemiddelgrupper innenfor farmakologisk behandling av psykiske lidelser. Antidepressiva er legemidler som brukes hovedsakelig mot depresjon. Antipsykotika anvendes i behandling av psykoser. Anxiolytika er angstdempende og beroligende. Hypnotika er legemidler som virker søvnfremmende [1]. Behandlingen krever individuell dosetilpasning. For å tilpasse doseringen kan terapeutisk legemiddelmonitorering benyttes slik at pasienten får optimal behandling. TDM er også et nyttig verktøy ved risiko for bivirkninger eller toksisitet til legemiddelbehandling. Nedenfor omtales antipsykotika og antidepressiva, de to legemiddelgruppene som er representert i oppgaven.

2.1.1 Antipsykotika

Psykose

Psykose er betegnelsen for tilstander med alvorlig mental dysfunksjon som kjennetegnes av realitetsbrist, som betyr forvrengt oppfatning av virkeligheten og forstyrret tenkning på grunn av hallusinasjoner og vrangforestillinger. Alvorlighetsgraden og den store funksjonssvikten forbundet med psykose er årsaker til at behandling, rehabilitering og oppfølging krever mye tid og ressurser, selv om psykose utgjør kun en mindre del av de psykiske lidelsene. Hovedsymptomer ved psykose er hallusinasjoner, vrangforestillinger og forfølgelsesideer. Disse symptomene gjør at pasienten feiltolker det som skjer i omgivelser og i egen kropp. Angst, uro og depresjon kan også forekomme ved psykose [20]. Personen med psykose og familien er utsatt for store påkjenninger. Psykose gir økt risiko for selvmord, spesielt i ung alder. Personer med langvarige lidelser har en betydelig redusert levealder [21].

Dopaminhypotesen

Dopaminhypotesen innebærer at psykoser er relatert til overaktivitet i dopaminerge nervebaner. Hypotesen underbygges ved at antipsykotika, som virker på dopaminreseptorene, reduserer intensiteten av de psykotiske symptomer. I tillegg kan stoffer som stimulerer dopaminsystemet, for eksempel amfetamin, utløse positive psykotiske symptomer [22].

Antipsykotika

Antipsykotikabehandling benyttes ved de fleste psykotiske tilstander. I 1950- og 1960 årene ble de første antipsykotika introdusert og den medikamentell behandlingen ble brukt i åpne psykiatriske avdelinger [22]. Hovedvirkningen til antipsykotika er blokkering av dopaminreseptorer (D2-reseptorer) i hjernen, men flere antipsykotika har også virkning på andre reseptorer. Antipsykotika gir både raskt innsettende beroligende effekt og langsomt innsettende effekt på psykosesymptomer. Den raskt innsettende effekten kommer i løpet av få timer etter inntak av legemidler, mens den langsomt innsettende effekten ofte kommer etter flere uker. Positive symptomer som vrangforestillinger og hallusinasjoner blir mindre intense og gradvis borte. Legemidler med antipsykotisk effekt har godt dokumentert virkning på symptomene ved psykoselidelser. Flere kontrollerte studier har vist at antipsykotiske legemidler har en bedre effekt enn placebo ved akutt psykosesymptomer, som desorganisering, hallusinasjoner og vrangforestillinger. Antipsykotikabehandlingen er anbefalt som

førstevalgsbehandling både ved akutte psykosesymptomer og for å forebygge tilbakefall. Forskjeller i reseptorbindingsprofiler og bivirkningsprofiler legger grunnlaget for fordeling av antipsykotika. Legemidlene er delt i *førstegenerasjons antipsykotika* (*First generation antipsychotics -FGA*) og *andregenerasjons antipsykotika* (*second generation antipsychotics-AGA*) [21].

Førstegenerasjons antipsykotika

Legemidler tilhørende *FGA* har sterk binding til D2 reseptorer. Legemidlene er delt i to undergrupper: *høydoseantipsykotika* og *lavdoseantipsykotika*. Legemidler i gruppen høydoseantipsykotika må ofte gis i doser over 100 mg per døgn for å oppnå antipsykotisk effekt. Dette er forbundet med økt risiko for bivirkninger, blant annet vektøkning og blodtrykksfall, siden de fleste midlene har antihistaminerg, antiadrenerg og antikolinerg virkning i tillegg til virkningen på D2-reseptorene. Eksempler på høydoseantipsykotika er klorpromazin og klorprotiksen. Eksempler på lavdoseantipsykotika er flufenazin, flupentiksol og haloperidol. Det er tilstrekkelig å gi doser lavere enn 10 mg per døgn for legemidler i gruppen *lavdoseantipsykotika* for å få en antipsykotisk effekt. Legemidlene har en sterk antidopaminerg virkning og akutte ekstrapyramidale bivirkninger forekommer ofte, men mindre sedasjon og vektøkning [23].

Andregenerasjons antipsykotika

AGA omfatter nyere antipsykotika med svakere blokkering av D2-reseptoreneme og de er i tillegg potente serotonin reseptor 2 (5-HT₂)-antagonister. Legemidlene gir derfor mindre D2-relaterte bivirkninger som motoriske og psykiske bivirkninger (apati og emosjonell hemming). Vektøkning, utvikling av insulinresistens og forstyrrelser i lipidstoffsiftet, forårsaket av mulig påvirkning av antihistamin og 5-HT₂-reseptorer, forekommer ofte hos personer som bruker andregenerasjons antipsykotika [21]. *AGA* bør brukes som førstevalg av medikament ved psykose hvis det er mulig, på grunn av den gunstige virkningen på kognitiv funksjon og negativ symptomer samt generelt bedre tolerabilitet. Aripiprazol, kvetiapin, olanzapin, risperidon og klozapin er noen av legemidlene som tilhører gruppen andregenerasjons antipsykotika [23].

2.1.2 Antidepressiva

Depresjon

Depresjon er en av de hyppigste psykiske lidelsene i Norge. Depresjonen forekommer hos både voksne, barn og ungdommer og forekomsten øker med alder. Flere kvinner enn menn vil oppleve depresjon [24]. Det er påvist en genetisk disposisjon av depresjon i tvillingstudier, men hvilke gener som disponerer ikke er kartlagt. Depresjoner kan utløses av fysiologiske forstyrrelser, somatiske sykdommer, bruk av rusmidler og sosiale eller psykososiale påkjenninger som skilsmisse eller dødsfall. Depresjon er en risikofaktor for økt dødelighet etter hjerteinfarkt og økt forekomst av demens senere i livet. Selvmord er en alvorlig komplikasjon av depresjon. Ved alvorlig depresjon er det stor selvmordsfare, særlig for de som har depresjoner og samtidig somatiske sykdommer, de som har rusmiddelproblemer og dårlig sosialt nettverk [25]. Det er to ulike former av depresjon, *unipolar depresjon* og *bipolar depresjon*. Ved *unipolar depresjon* vil stemningsleiet være kontinuerlig redusert, mens stemningsleiet svinger mellom depressive og maniske episoder ved *bipolar depresjon* [26]. Forstyrrelse i regulering av hypothalamus-hypofyse-binyreaksen er en patologisk årsak til depresjon. Lite energi er resultat av nedsatt noradrenerg transmisjon, mens manglende opplevelse av glede, motivasjon og tilfredsstillelse er forårsaket av nedsatt dopaminerg neurotransmisjon. Svekket serotonerg neurotransmisjon fører til nedstemthet, angst, irritabilitet og forstyrrelser i søvn og matlyst [25].

Monoaminhypotesen

Monoaminhypotesen er utviklet av Schilkraut i 1965 og går ut på at depresjon er forårsaket av forstyrrelse av funksjonen til monoamintransmittere som serotonin og noradrenalin i hjernen [26]. Et overskudd av disse monoaminene i hjernen vil gi maniske symptomer, mens mangel på disse vil føre til nedstemthet og depresjon. Hypotesen er bygd opp fra farmakologiske beviser om at legemidler som øker konsentrasjonen av serotonin og noradrenalin i hjernen har en klinisk effekt mot depresjon, og legemidler som senker konsentrasjon av disse forverrer depresjon. Schilkrauts hypotese er et godt hjelpemiddel for å forstå virkningsmekanisme til ulike type antidepressiva da det ikke foreligger noen klar patofysiologisk beskrivelse av depresjon.

Antidepressiva

Antidepressiva motvirker forstyrelsen av funksjonen til monoamintransmittere som serotonin og noradrenalin hos en deprimert person. Antidepressiva deles i flere grupper, blant annet monoamin opptakshemmere, monoamin reseptoragonist og monoamin oksidasehemmere (*monoamine oxidase inhibitors, MAOIs*). Nedenfor skal ulike grupper av monoaminopptakshemmere som hindrer reopptak av monoaminene i ulik grad diskuteres.

Uselektive monoaminopptakshemere (tricyclic antidepressants, TCA)

Uselektive monoaminopptakshemere kalles også trisykliske antidepressiva (TCA). Legemidler i gruppen hemmer reopptak av serotonin og noradrenalin. I tillegg har TCA antikolinerg og antihistaminerg virkning, noe som ofte gir plagsomme bivirkninger. TCA har smalt terapeutisk vindu og er svært farlig ved overdosering. Dårlig toleranse og plagsomme bivirkninger er årsaker til at TCA ikke er førstevalg ved depresjon. Amitriptylin, doksepin, klomipramin og trimipramin er eksempler på legemidler i gruppen TCA. De fleste legemidlene har sterk proteinbinding. De har lang virkningstid og konverteres ofte til aktive metabolitter som har lang halveringstid, opptil 90 timer (nortriptylin). Legemidlene anvendes ved depresjon med somatisk syndrom. De brukes også ved nevrologiske smerter [26].

Selektive serotoninreopptakshemmere (selective serotonin reuptake inhibitors, SSRI)

Selektive serotoninreopptakshemmere er den nye generasjon av antidepressiva som hemmer reopptak av serotonin. De gir mindre antikolinerge effekter. Dette betyr at de er mindre toksiske og har mindre plagsomme bivirkninger enn TCA. SSRI kan derfor brukes av både barn og voksne. Denne gruppen er førstevalget ved behandling av depresjon. Legemidlene brukes også mot angst. Paroksetin, sertralin, fluvoksamin, fluoksetin og citalopram er eksempler på SSRI. SSRI har lang virkningstid [26]. Aktive metabolitter har plasmahalveringstid fra omtrent 60 timer opptil 4-16 døgn (norfluoksetin) [27].

Serotonin-noradrenalinreopptakshemmene (serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors, SNRI),

Serotonin-noradrenalinreopptakshemmere hemmer reopptak av noradrenalin og serotonin uten å ha effekter på histaminerge, muskarinerge og adrenerge reseptorer. Dette betyr at SNRI gir mindre sedasjon og vektøkning. Legemidlene er egnet for eldre pasienter. Eksempler på SNRI

er duloksetin og venlafaksin. SNRI brukes også ved angstlidelse. Duloksetin har dokumentert effekt på nevrologiske smerter. Plasmahalveringstiden er på mellom 5 til 17 timer for SNRI og deres aktive metabolitter [28].

2.1.3 Terapeutisk legemiddelmonitorering

Terapeutisk legemiddel monitorering (*therapeutic drug monitoring, TDM*) innebærer analyse av legemidler i serum eller plasma fra pasienter for å sikre optimal legemiddelbehandling for pasientene. TDM utføres for legemidler med smalt terapeutisk område og legemidler hvor farmakologisk effekt er vanskelig å vurdere på grunn av individuell variasjon i farmakokinetikk. TDM er i tillegg et nyttig verktøy i forbindelse med problemstillinger som undersøkelse av etterlevelse av forskrevet inntak av legemidler, manglende effekt av behandling og bekreftelse på toksisitet og bivirkninger [6].

Generelt kan prøve til TDM tas etter at legemiddelkonsentrasjonen i blod innstiller seg mot likevekt (steady state), med andre ord skal man vente minst fire-fem ganger halveringstiden fra oppstart av medikamentet for å ta prøve for TDM. Prøven for TDM tas vanligvis like før neste planlagte dose når konsentrasjonen av medikamentet er lavest [6, 29]. Generelt benyttes serum og plasmaprøver i TDM. Fullblodprøver er svært lite egnet for TDM, siden fullblod koagulerer umiddelbar etter prøvetaking og det er vanskelig å bearbeide koagulert blod for videre analyse. Serum og plasma prøvene analyseres normalt enten ved væskekromatografi (HPLC) eller gasskromatografi (GC). Væskekromatografi sikrer en kvantitativ analyse av legemiddel med høy kvalitet og er mest brukt innenfor TDM. Dette skyldes at metoden har høy spesifisitet, høy sensitivitet og høy grad av nøyaktighet og presisjon [5, 6].

En gruppe spesialister, *Arbeitsgemeinschaft für Neuropsychopharmakologie und Pharmakopsychiatrie (AGNP)*, har utviklet retningslinjer for optimalisering av bruken av TDM innen psykofarmakoterapi [5]. Retningslinjene er et nyttig verktøy for psykiatere og laboratorier som jobber med analyse av psykofarmaka. Det er 65 psykofarmaka som inkluderes i retningslinjene. Fem anbefalingsnivåer er definert i retningslinjene: sterkt anbefalt (nivå 1), anbefalt (nivå 2), nyttig (nivå 3), potensielt nyttig (nivå 4), ikke anbefalt (nivå 5). Indikasjon for TDM innen psykoterapi er blant annet bruk av litium, mangel av klinisk effekt eller utilstrekkelig effekt, mulige bivirkninger ved terapeutisk dose, ved mistanke om legemiddelinteraksjoner, ved farmakokinetisk variabilitet, ved endret farmakogenetikk

(enzymaktivitet), ved polyfarmasi og rettspsykiatri, og TDM for psykofarmaka til barn, eldre og gravide [5].

TDM av antipsykotika er en kompleks prosess. Prosessen starter med en forespørsel om TDM som enten ved rutinemonitorering (for eksempler ved start av nytt medikament eller bytting av medikament) eller ved et spesifikt problem (for eksempel mangel/utilstrekkelig effekt, bivirkninger ved terapeutiske doser, potensielle legemiddelinteraksjoner). Videre blir det tatt blodprøve og resultater fra blodprøven diskuteres i forhold til pasientens tilstand. Prosessen slutter med vurdering om nødvendighet for endring av farmakoterapi for å optimalisere legemiddelbehandlingen [5].

For ulike SSRI og SNRI anses TDM som anbefalt og nyttig. Legemidler i gruppen TCA og antipsykotika viser stor interindividuell variasjon i farmakokinetikk effekt. TCA gir alvorlige bivirkninger på hjerte- og karsystemet ved høye konsentrasjoner. Antipsykotika gir ofte plagsomme bivirkninger, noe som kan føre til dårlig legemiddeletterlevelse [29]. For de fleste trisykliske antidepressiva (TCA) er TDM derfor anbefalt. TDM er i tillegg et nyttig verktøy for å unngå overdosering og forgiftning, siden TCA har smalt terapeutisk vindu og derfor er farlige ved overdose. TDM er anbefalt/sterk anbefalt for antipsykotika. TDM benyttes for å overvåke overdosering og bivirkninger av antipsykotika. TDM er også nyttig ved endring fra vanlig tablett til depot formulering [5].

2.2 Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS)

VAMS er en alternativ metode for prøvetaking av blodprøver for kvantitativ bioanalyse. VAMS-metoden ble første gang beskrevet i 2014 [12]. VAMS er forkortelse av Volumetric Absorptive Microsampling, VAMS vil i denne oppgaven også bli brukt om en enkelt oppsamlingsenhet (Volumetric Absorptive Micro Sampler). En VAMS har en hvit absorberende, porøs hydrofil tipp som er festet til et plasthåndtak. Det spesielle designet til tippet tillater absorpsjon av et nøyaktig volum ved hjelp av kapillærkrefter uavhengig av hematokrit-nivå. Egenskaper til tippet avgjør volum av prøve (10-20µl). Ved prøvetaking skal overflaten av tippet dyppes i blod i en 45 graders vinkel. I noen få sekunder (2-4 sekunder) blir tippet fylt med blod slik at den er rød etter prøvetakingen. Etter den er helt rød skal tippet holdes i prøven to sekunder ekstra for å sikre at tippet er helt full av blod. VAMS-prøvene er

ofte tørket ved romtemperatur to timer etter prøvetakingen. Deretter kan VAMS-prøvene enten oppbevares inntil analyse eller transporteres til laboratorier for analyse [9].

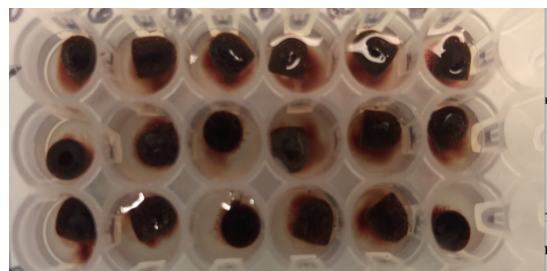
VAMS-prøvetaking er enkelt å utføre og VAMS-prøver trengs ikke tas av helsepersonell, noe som betyr at pasienten kan selv ta prøve hjemme og sende prøven til laboratoriet. Det er lite tappevolum (10-20 µl). VAMS-prøvene kan oppbevares i romtemperatur, hvor holdbarheten kan variere fra en dag til noen måneder. Dette betyr at det er lavere kostnader med å transportere og oppbevare prøvene siden prøvene ikke må fryses ned. Holdbarheten bli lengre ved oppbevaring i lavere temperatur. En annen fordel med VAMS er at tippet kan overføre direkte til donorbrønn i PALME og hele «prøvesvampen» kan derfor ekstraheres uten videre arbeidstrinn. Forbindelser i VAMS kan ekstraheres med ulike løsemidler og ekstraktet kan analyseres direkte etter ekstraksjon.

Flere validerte kvantitative analysemetoder har blitt brukt for terapeutisk legemiddelmonitorering og bestemmelse av farmakokinetiske parametere. Ved siden av fordelene er det fortsatt noen problemer ved anvendelsen av VAMS, blant annet holdbarhet av komponenter i VAMS, hematokrit-avhengig utbytte for noen komponenter og avvik i konsentrasjoner oppnådd etter VAMS og andre prøvetakingsmetoder. Disse problemene bør løses før VAMS blir brukt til TDM [9].

A)



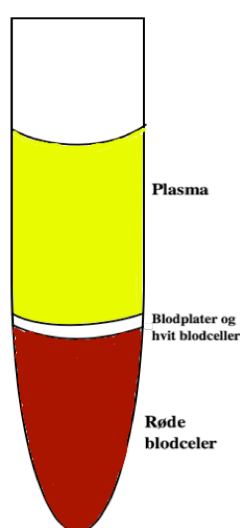
B)



Figur 1: A) *Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) med 20 µl Mitra Microsampler 4-sampler Clamshell. VAMS med hvit tipp er ubrukt. VAMS med rød tipp er brukt VAMS som inneholder fullblod etter prøvetaking.* B) *Tre rader med VAMS-tipper i 96-brønnplaten som er klare for PALME-ekstraksjon.*

2.3 Fullblod som analysemedium

Fullblod utgjør 6-8 % av kroppsvekten og består av flere type celler; røde blodceller (erytrocytter), hvite blodceller (leukocytter) og blodplater (trombocytter) og en klar væske som kalles plasma. Plasma utgjør omtrent 55 % av totalt blodvolum, røde blodceller utgjør omtrent 44 % av blodvolumet og hvite blodceller og blodplater utgjør omtrent 1% av fullblod. Plasma har god bufferkapasitet med pH rundt 7,4. Plasma består mest av vann. I tillegg finnes det plasmaproteiner og små uladete forbindelser (glukose, urea) og ioner (Na^+ , HCO_3^- og Cl^-) i plasma. Viktige plasmaproteiner er albumin, globulin og fibrinogen [30].



Figur 2: Blodets sammensetning etter sentrifugering. Modifisert fra [31].

Plasmaproteinene kan binde seg til legemidler som er til stede i blod. Sure legemidler og noen basiske legemidler vil hovedsakelig binde seg til albumin, mens mange basiske legemidler vil binde seg til alfa 1-globulin. Proteinbindingsgrad avhenger i stor grad av den kjemiske strukturen til legemidler og varierer derfor fra legemiddel til legemiddel. Proteinbindingsgrad varierer også fra person til person. Det er den frie fraksjonen av legemiddel (andelen av legemidler som ikke binder seg til proteiner) som gir den vesentlige effekten hos pasienten, men de terapeutiske områdene er oppgitt i forhold til den totale mengde av legemidlet i prøven. I forbindelse med TDM er det derfor viktig å være sikker at det er den totale mengden av legemiddel i prøven som blir målt [6].

Det er mange ulemper ved å bruke fullblod som analysemedium. Fullblod koagulerer umiddelbart etter prøvetaking. Koagulert blod er vanskelig å bearbeide for videre analyse [6]. Innholdet av blodceller kan skape problem under analyse. Proteinene i blod og plasma er store molekyler som kan tette og ødelegge væskrokromatografi (LC) eller gaskromatografi (GC) kolonne hvis de ikke blir fjernet før analyse. Noen forbindelser kan forstyrre signalintensitet til analytt og kvalitet til kvantitativ analyse til analytt kan bli redusert. En annen typisk matrikskomponent er fosfolipider som kan påvirke signalet til detektoren av analyseinstrumentet i form av ioneundertrykkelse og ioneforsterkning. Fosfolipidene bør fjernes før analyse slik at ioneundertrykkelsen og ioneforsterkning kan unngås [6, 14].

Fullblod blir ofte konverteres til enten serum eller plasma ved sentrifugering i TDM. Serum/plasma prøvene må oppbevares kaldt og beskyttes mot lys for å hindre degradering [6]. Fullblod kan samles i form av *dried blood spots* (DBS), hvor en dråpe blod er påsatt et papir eller filterpapir og tørkes [30]. En annen alternativ for DBS er *Volumetric Absorptive Microsampling* (VAMS), hvor bloddråpe blir absorbert til tippene av VAMS og tørket. Fordeler med DBS og VAMS er at prøvetakingene er enkle. Det er lettere med transport da prøvene ikke må oppbevares kaldt og størrelse av DBS-kort og VAMS er relative små.

2.4 Prøveopparbeidelse

I biologiske analyser har prøvene en kompleks sammensetning og de kan derfor ikke analyseres direkte. De må opparbeides før analyse. Hensikten med prøveopparbeidelse er opprensing av prøven og oppkonsentrering av analytt slik at analyseapparatet kan detektere analytten [14, 32]. Fullblod, plasma, serum og urin er ulike prøvematriksene som brukes mye innen bioanalyse. Disse matriksene er komplekse blandinger og inneholder komponenter som kan forårsake matrikseffekt ved bruk av LC-MS. Fosfolipider er en av komponentene som er kjent for å gi matrikseffekt. Fosfolipidene ko-eluerer med analyttene og de kan påvirke ionisering av analyttene i form av ioneundertrykkelse eller ioneforsterkning og dermed påvirke kvantitativ analyse av analyttene. Fullblod og plasma inneholder også proteiner. Disse er store molekyler som kan tette og ødelegge kolonnene i HPLC-MS og GC. Fosfolipidene og proteinene samt andre forurensninger bør fjernes før analyse. Konsentrasjonen av analytt i biologiske prøver er ofte lav. Konsentrasjonsnivåene ligger typisk i området 0,1 ng/ml til 1 µg/ml. Konsentrasjonen kan være så lav at analytten ikke kan detekteres av analyseapparatet. Det er derfor ønskelig å oppkonsentrere analytt slik at analyseapparatet kan detektere analytten [14].

Det finnes forskjellige strategier for prøveoppbeidelsen. Hvilken strategi som benyttes er avhengig av type prøvemaktrijs som skal analyseres, egenskaper til analyttene og konsentrasjon av analyttene i prøven. De mest anvendte prøveoppbeidelsesmetodene er proteinfelling (*protein precipitation*), *Dilute-and-shoot* som brukes på urinprøver, væske-væske-ekstraksjon (*liquid-liquid extraction, LLE*) og fast-fase-ekstraksjon (*solid-phase extraction, SPE*). Ved bruk av proteinfelling vil en proteinfellingsreagens tilsettes prøven slik at proteinene feller ut og fjernes fra prøven. Proteinfelling brukes til blod og plasma-prøver. Ved LLE og SPE vil analytt isoleres fra prøven ved ekstraksjon.

LLE er en viktig prøveoppbeidelsesmetode som gir mulighet for både opprensing og oppkonsentrering. PALME-ekstraksjonsteknikk som benyttes i oppgaven er basert på væskefase-mikroekstraksjon (LPME) som er utviklet fra tradisjonell LLE. Både LLE, LPME og PALME beskrives i **avsnitt 2.4.1-2.4.2**.

2.4.1 Væske-væske ekstraksjon (LLE)

Prinsippet for LLE er basert på egenskapen stoffer har til å fordele seg mellom to ikke-blandbare faser, ofte er det en vandig fase og en organisk fase. Den organiske fasen bestående av en eller flere organiske løsemidler bør være et godt løsemiddel for analytter og dårlig løsemiddel for forurensninger. I legemiddelanalyse er prøveløsningen typisk en vandig løsning/matriks, og analytt ekstraheres fra vandig løsning over til en væske som ikke er blandbar med vann [33].

Fordeling av analytt mellom to ikke-blandbare væsker beskrives av to uttrykk, fordelingskoeffisienten (K_d) og fordelingsforholdet (D). Fordelingskoeffisienten K_d er definert som fordeling av den nøytrale formen av stoffet mellom vannfasen og den organiske fasen. K_d er en karakteristisk egenskap for stoffet. Fettløselig stoffer har høy fordelingskoeffisient og disse stoffene er mye mer løselig i organiske løsemidler enn i vannfasen. Stoffet som har fordelingskoeffisient større enn ti egner seg godt for væske-væske-ekstraksjon, hvor større K_d også gir høyere ekstraksjonsutbytte [33]. Formelen til fordelingskoeffisienten K_d er:

Formel 1 [33]:
$$K_d = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$

[A]_{org} = konsentrasjon av stoff i organisk fase

[A]_{aq} = konsentrasjon av stoff i vandig fase

Fordelingsforholdet D benyttes når analytt er enten base eller syre. For nøytrale stoffer vil ikke pH påvirke fordelingskoeffisienten, og fordelingskoeffisienten vil være lik fordelingsforholdet. Basiske og sure stoffer vil dissosiere i vandig fase. Både den nøytrale og den ioniserte formen vil dermed foreligge i vannfasen. I vandig fase er konsentrasjonen lik summen av den nøytrale og ionisert formen av stoffet. Fordelingsforholdet for svake baser er oppgitt i **formelen 2**:

Formel 2 [33]:

$$D = \frac{C_{org}}{C_{aq}} = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq} + [AH]_{aq}^+} = K_d \times \frac{K_a}{[H_3O]^+ + K_a}$$

C_{org} = molar konsentrasjon av base i organisk fase

C_{aq} = molar konsentrasjon av base i vandig fase

K_a = dissosiasjonskonstant for korresponderende syre, AH^+

Jo større fordelingsforhold, jo høyere ekstraksjonsutbytte oppnås. **Formelen 2** viser at fordelingsforholdet påvirkes av både fordelingskoeffisient, pH i vannfasen og stoffets pK_a -verdi. Fordelingskoeffisienten og stoffets pK_a -verdi er konstante og fordelingsforholdet vil påvirkes mest av pH i vannfasen. Fordelingsforholdet for basiske stoffer kan økes ved å justere pH til to pH enheter over pK_a -verdien til stoffene. I dette pH-området vil stoffene få optimal løselighet i organiske fase og dermed høyt ekstraksjonsutbytte [33].

LLE kan utføres i et tofasesystem. Tofasesystem består av en vandig prøveløsning og en organisk mottakerfase, hvor analytt ekstraheres fra vandig prøveløsning over i organisk fase. Ekstraksjon bør pågå til likevekt er oppnådd i systemet. Organisk fase må dampes av og ekstraktet reløses i mobilfase før analyse. For ytterligere opprensing kan analytten ekstraheres fra en vandig prøve, over i en organisk fase, og tilbakeekstraheres til vandig mottakerfase. Dette gir høyere grad av selektivitet siden nøytrale lipofile stoffer med tilstrekkelig høy K_d , og som kan ekstraheres sammen med analytt over i organiske fase, blir igjen i den organisk fasen ved tilbakeekstraksjon. En annen fordel er at stoffene er løst i en vandig fase etter ekstraksjon som kan injiseres direkte i HPLC-MS [33].

Fordeler ved bruk av LLE som prøveopparbeidelsesmetode er blant annet at prosedyren er lett å standardisere, løsemidler er lett tilgjengelige fra leverandør og metoden gir både rene prøver og mulighet for oppkonsentrering av analytt fra biologiske materialer. Ulemper ved LLE er at metoden ikke er så godt egnet for automatisering og analyse av store prøveserier. Metoden

krever i tillegg store mengder av organiske løsemiddel. Det er ikke gunstig med tanke på helse, miljø og sikkerhet, siden mange av organiske løsemidler er toksiske og brennbare [33].

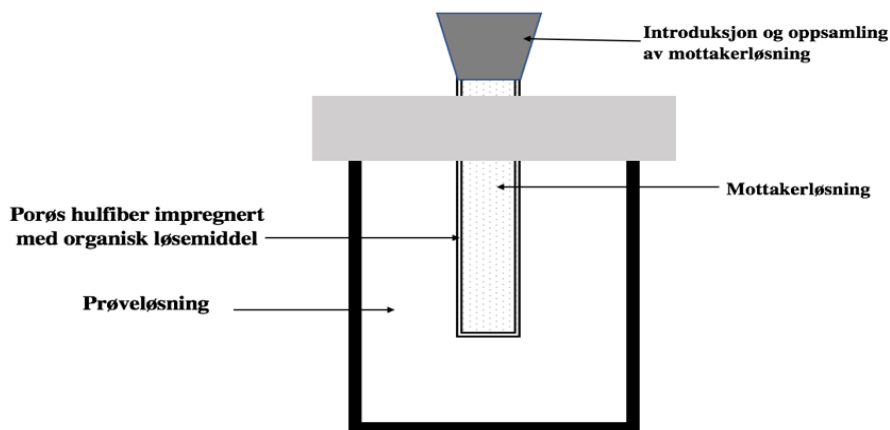
2.4.2 Væske-væske mikroekstraksjon (LPME)

Væske-væske mikroekstraksjon (LPME) er en miniaturisert form for LLE. Utvikling av den miniaturiserte formen hadde som formål å unngå ulempene av LLE ved ekstraksjon i store skalaer. Ved LPME vil volum av prøveløsning og organisk løsemiddel reduseres. En annen fordel er at ekstraksjonsprosessen kan automatiseres. LPME er mer tidseffektivt og lettere å ta i bruk sammenlignet med LLE, siden alle prosesser, prøvepåsetting, ekstraksjon, isolering og oppkonsentrering skjer i ett og samme trinn. LPME kan deles i tre teknikker: *single drop microextraction* (SDME), *hollow-fiber liquid-phase microextraction* (HF-LPME) og *dispersive liquid-liquid microextraction* (DLLME) [34].

Væske-væske mikroekstraksjon med porøs hulfiber (*hollow-fiber liquid-phase microextraction*, HF-LPME) ble først introdusert i 1999 av Pedersen- Bjergaard og Rasmussen, hvor organisk væskemembran (*supported liquid membrane*, SLM) for første gang ble integrert i et enkelt, rimelig engangsoppsett for væske-væske-væske mikroekstraksjon (*liquid-liquid-liquid microextraction*, LLLME). SLM dannes ved å dyppe hulfiberen i et organisk løsemiddel (1-oktanol) og et μl -volum av løsemiddelet trekkes inn i hulfiberen ved hjelp av kapillærkrefter. Før hulfiberen plasseres i en beholder med prøvematriks (donorløsningen) er hulrommet av hulfiberen fylt med akseptorløsningen [16, 35].

I væske-væske mikroekstraksjon danner den organiske væskemembranen en fysisk barriere mellom to løsninger, en prøveløsning og en akseptor løsning. Hvis akseptorløsningen er en organisk løsning dannes et tofase-system med likt ekstraksjonsprinsipp som i LLE. Hvis akseptorløsningen er en vandig løsning dannes et trefase-systeme (HF-LPME), hvor prinsippet er likt LLE med tilbakeekstraksjon [35]. Oppsettet for trefase-LPME er illustrert i **figur 3**.

Drivkraften for transporten av analytt over væskemembranen er passiv diffusjon, elektrisk potensiell differanse gjennom membranen og trykk-påsetting på membranen. Passiv diffusjon er mest brukt innenfor bioanalyse og er drevet av pH gradient [14]. Flere parametere styrer ekstraksjon i LPME; type organiske løsemiddel, type hulfibermateriale, pH i akseptorløsningen og donorfasen, ekstraksjonstid, temperatur og saltinnhold [34].

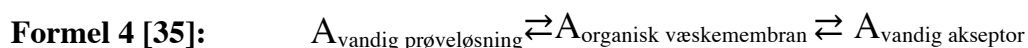


Figur 3: Skjematisk fremstilling av engangsoppsettet for 3-fase HF-LPME , modifisert fra [36].

Fordeling av analytt i tofase-systemet er beskrevet i **formel 3**. I likhet med LLE, ekstraheres analytt fra prøveløsning over i en organisk akseptorfase (akseptorløsning). For å oppnå optimalt utbytte skal fordelingskoeffisienten (K_d) være høy. For syrer og baser skal pH justeres slik at K_d skal være høyest mulig. Tofase-systemet er egnet for analytter som har lav eller medium polaritet som skal analyseres med gasskromatografi (GC) [37].



Fordeling av analytt i trefase-systemet er vist i **formel 4**. Analyttene ekstraheres fra vandig prøveløsning, over i SLM, og videre i vandig akseptorløsning. pH i både prøveløsning og mottakerløsning justeres slik at analyttene er i nøytral form i prøveløsningen og ionisert form i akseptorløsningen. Fordelingskoeffisienten skal være høy nok til at analyttene ekstraheres over i organisk væskemembran, men samtidig lav nok for å fremme overgang fra organisk væskemembran til akseptorløsning.



LPME er egnet for ekstraksjon av ikke-polare og medium-polare stoffer fra ulike matrikser. LPME er en effektiv metode for opprensing av prøveløsning og oppkonsentrering av analytter. Et utfordring for LPME er at metoden er utviklet med hjemmelaget utstyr og det er nødvendig med kommersielt tilgjengelig utstyr for at metoden skal kunne brukes i rutinelaboratorier [35].

2.4.3 Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME)

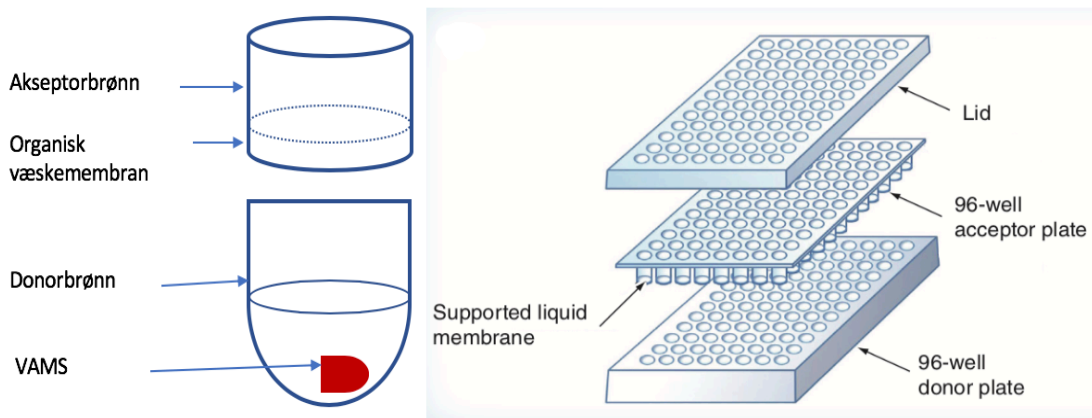
Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) er modifisert form av trefase HF-LPME der tynne flate membraner (SLM) inkorporert i et 96-brønnsformat erstatter den porøse hulfiberen. Som nevnt tidligere ble PALME introdusert i 2013 [18]. PALME er egnet for biologiske prøver med lave volum, tidligere studier har vist gode resultater for ca. 100 µl plasma [38] og fullblod [39, 40] og også for DBS [41] og VAMS [42]. PALME er også egnet til ekstraksjon av legemidler fra plasma/serumprøve, siden metoden effektivt eliminerer fosfolipidene som forårsaker matrikseffekt i LC-MS systemet [43].

PALME-oppsettet består av en 96-brønns donorplate, en 96-brønns akseptorplate med filter på bunnen av hver brønn og en forseglingsfilm laget av aluminium [37, 44]. En 96-brønnsplate laget av polypropylen brukes som donorplate. Hver brønn i donorplaten har et totalvolum på 500 µl. Det totale volumet til donorløsningen (biologisk prøve + internstandardløsning + buffer/syre/base) er optimalt mellom 200-250 µl, typisk 250 µl i hver brønn. pH verdi i donorbrønn justeres slik at analytten skal være i sin nøytrale form for effektiv overgang til SLM. Filteret i bunnen av hver brønn i akseptorplaten er laget av porøs polyvinylidenfluorid (PVDF). Volumet til organisk væske er typisk mellom 3 og 5 µl. Organisk væske må være uløselig i vann slik at væskene i donorplaten og akseptorplaten som hovedsakelig er vandige løsninger skilles fra hverandre [44]. Det er observert at PVDF-filteret kan gi uspesifikke bindinger av analyttene og ekstraksjonsutbyttet blir dermed redusert. Dette kan omgås ved å bytte ut PVDF med polypropylen [18]. Siden 96-filterbrønnsplater med PP ikke er kommersielt tilgjengelig, så har tidligere studier vist at en alternativ løsning kan være å tilsette 1 % trioktylamin (TOA) til væskemembranen for å maskere disse bindingssetene og øke ekstraksjonsutbyttet [38, 40, 45]. Volumet av akseptorløsningen er vanligvis 50 µl og volumet av donorløsningen er ofte 250 µl, noe som gir en teoretisk fem ganger oppkonsentrering av analyttene. Dette muliggjør deteksjon av analyttene i lave konsentrasjoner i prøveløsningen. Akseptorløsningen er kompatibel med LC/MS-MS og ekstrakter kan derfor injiseres direkte i analyseinstrumentet uten et ekstra inndampingstrinn [44].

Ved PALME diffunderer analyttene fra donorfasen, over i organisk væske membran, og videre til akseptorfasen. pH er en viktig parameter for optimal ekstraksjon mellom fasene og pH i fasene justeres slik at ionisering til analyttene undertrykkes i donorfasen, mens analyttene foreligger i ioniserte former i akseptorfasen. pH justeringen mellom de to fasene danner en pH-gradient som driver overgang av basiske eller og sure analytter, avhengig av pH, mellom

donorfasen og den kunstige væskemembranen, og mellom den kunstige væskemembranen og akseptorfasen ved hjelp av passiv diffusjon [44]. For basiske analytter gjøres pH i donorfasen basisk og pH i akseptorfasen sur slik at analyttene forblir i nøytral form i donorløsningen, og i ionisert form i akseptorløsningen. den ionisert formen av analyttene hindrer tilbake-ekstraksjon til SLM [18]. For sure analyttene gjøres pH i donorfasen sur og pH i akseptorfasen basisk slik at analyttene ekstraheres fra donorløsningen, over i SLM, videre til akseptorløsningen [46]. Løselighet av analyttene i organisk væskemembran og akseptorløsning er avgjørende faktorer for ekstraksjonsutbytte [46]. Høy fordeling av analytter til akseptorløsning og dermed høyt ekstraksjonsutbytte kan oppnås ved å endre ulike ekstraksjonsparametere, for eksempel sammensetning og pH i både akseptor- og donorløsning, samt type organisk væskemembran.

PALME kan utføres med en enkel prosedyre, og innen relativt kort tid (15-60 minutter) kan 96 prøver ekstraheres samtidig. PALME gir god opprensning og et lavt forbruk av organisk løsemiddel. Metoden gir i tillegg gode muligheter for oppkonsentrering av en rekke analytter med ulike kjemiske egenskaper [18, 37].



Figur 4: PALME-oppsettet. Venstre: Ekstraksjonsenhet med VAMS i donorbrønn. Høyre: Donorplate (96-well donor plate), akseptorplate (96-well acceptor plate), organisk væskemembran (supported liquid membrane) og topplokk (lid); hentet fra [18].

2.5 Væskekromatografi

Væskekromatografi er den mest brukte metoden til å separere analytter i biologisk materiale innen legemiddelanalyse. Separasjonen er basert på fordeling av analyttene mellom to faser, en mobilfase og en stasjonærfase. Mobilfasen består av en væske og er den fasen som beveger seg og transporterer analyttene. Stasjonærfasen består av faste partikler som er pakket i et rør, en kolonne, slik at de holder seg i ro inni kolonnen og retarderer analyttene. Prøve med analyttene injiseres i strømmen av mobilfasen. Mobilfasen pumpes gjennom kolonnen med en konstant hastighet og analyttene transporteres gjennom kolonnen. Analyttene interagerer med aktive grupper på overflaten av kolonnepartiklene og retarderes. De som har mer interaksjon med stasjonærfasen retarderes mer. Analyttene vil derfor få forskjellig hastighet og når detektoren til ulik tid [47]. Detektoren måler hvor mye stoff som kommer ut av kolonnen som funksjon av tiden. Resultatet rapporteres som et kromatogram, hvor detektorresponsen for analytten er plottet mot retensjonstiden (tiden analytten oppholder seg i kolonnen) [48].

Væskekromatografi omfatter tynnssjikt-kromatografi (*thin-layer chromatography*, TLC) og *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). I HPLC pakkes partiklene i kolonner, i TLC er partiklene spredt utover en plate. Væskekromatografi var først utviklet ved bruk av en polar stasjonærfase og en upolar mobilfase. Dette systemet kalles normalfase-kromatografi. På slutten av 60-tallet introduseres omvendt-fase-kromatografi, hvor det var mulig å analysere vandige prøveløsninger direkte. Omvendt-fase-kromatografi ble siden det viktigst separasjonsprinsippet i væskekromatografi. *Ultrahigh-pressure liquid chromatography* (UHPLC) er en videreutvikling av HPLC. Ved bruk av UHPLC vil både analysetiden og forbruket av mobilfase reduseres, samtidig vil følsomheten til apparatet økes sammenlignet med HPLC [49]. Både omvendt-fase-kromatografi, HPLC og UHPLC blir beskrevet nærmere i neste avsnitter.

2.5.1 Omvendt-fase-kromatografi

I denne oppgaven ble omvendt-fase-kromatografi brukt som separasjonsmetode. Omvendt-fase-kromatografi er det viktigst separasjonsprinsippet i væskekromatografi. I omvendt-fase-kromatografi er stasjonærfasen hydrofob og mobilfasen er en mer polar vandig løsning. Metoden brukes ofte for separasjon av små molekyler, peptider og noen grad for separasjon av proteiner [48].

Stasjonærfaser i omvendt-fase-kromatografi er ofte derivatisert silika. Silanolgrupper på silika er derivatisert med ulike reagenser slik at det dannes ulike stasjonærfaser med forskjellige egenskaper. Silanolgrupper som ikke er derivatisert (restsilanolgrupper) kan ionisere og gi ioniske interaksjoner med basiske stoffer og basiske stoffene vil i såfall elueres med haledannelse. For å eliminere problemet derivatiseres restsilanolgruppene med trimetylklorosilan, *endcapping*. Oktadekyl-silika (C18) som har en hydrokarbonkjede med 18 karbonatomer er den mest vanlige hydrofobe fasen [48]. En kolonne pakket med oktadekylsilika og «end-cappet» materiale (Waters, Aquiy HSS T3) ble benyttet i oppgaven.

I omvendt-fase-kromatografi er stasjonærfasen mer hydrofob enn mobilfasen og hydrofob interaksjon er dermed hovedsakelig retensjonsmekanismen. C18-materialet gir størst retensjon. Jo kortere de hydrofobe kjedene på stasjonærfasen er, desto mindre blir retensjonen. *Van der Waals-krefter* er de viktigste interaksjonskreftene, som er relativt svake krefter som øker med molekylstørrelsen. Ikke-polare analytter retarderes sterk, mens mer polare analytter vil elueres tidligere og får dermed kortere retensjonstid. For stoffer med ioniserbare funksjonelle grupper vil retensjon være avhengige av ionisering av gruppene og dermed pH i mobilfasen, og retensjonen avtar med økende ionisering. I tillegg til egenskapene til stasjonærfasen og pH i mobilfasen (ved separasjon av syrer eller baser) er retensjonen påvirket av blant annet elueringsstyrken til mobilfasen og temperaturen i kolonnen [48].

Mobilfasen er typisk en blanding av vann og organisk løsemiddel som er blandbart med vann. Acetonitril (ACN) og metanol (MeOH) benyttes hovedsakelig som organisk løsemiddel. MeOH er ofte førstevalget som organiske løsemiddel, siden MeOH er mindre toksisk og billigere enn ACN. Mengde og type organisk løsemiddel bestemmer styrken på mobilfasen. For nøytrale analytter styres retensjonen av innhold av organisk løsemiddel i mobilfasen, hvor retensjonen avtar ved økende mengde og styrke av organisk løsemiddel. For analytter med ioniserbare grupper vil retensjonen være avhengig både av innhold av organisk løsemiddel og av pH til mobilfasen. pH i mobilfasen styres ved å tilsette buffere. Endring av pH i mobilfasen kan gi store endringer i separasjonens selektivitet ved separasjon av syrer eller baser. Retensjonen er størst for analytt ved en pH i mobilfasen hvor ionisering av fullstendig undertrykket. pH i mobilfasen skal velges slik at analyttene enten er fullstendig ionisert eller ioniseringen er undertrykket. pH må i tillegg være i området 2-8 når silikabaserte stasjonærfaser benyttes, siden de funksjonelle gruppene kan spaltes av ved pH lavere enn 2 og silika løses opp i basisk miljø med pH over 8 [48].

2.5.2 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC er den mest brukte metoden for bestemmelse av legemidler i farmasøytisk preparater og biologisk materiale. HPLC-apparaturen består hovedsakelig av pumpe, injektor, kolonne og detektor. Pumpen presser mobilfasen gjennom kolonnen laget av materialer som retarderer analytter i prøve. Prøve med analyttene injiseres inn i mobilfasestrømmen via en injektor før kolonnen. Mobilfasen kan enten ha samme sammensetning under separasjonen (isokratisk eluering) eller sammensetningen kan endres under separasjonen (gradienteluering). Analyttene blir separert med ulike retensjonshastigheter i kolonnen. Analyttene som elueres fra kolonnen, detekteres av en detektor. Mange HPLC-apparater har i tillegg en programvare som styrer hele systemet, også injeksjon av prøvene som står i autoinjektoren, slik at hele analyseprosessen kan automatiseres. Slike HPLC-systemer kan analysere prøver og rapportere resultater 24 timer i døgnet. Pakkemateriale i kolonnen består typisk av 3-5 μm silikapartikler med en hydrofil eller hydrofob overflater. Liten partikkelstørrelse bidrar til høy kvalitet på separasjonen, likevel har HPLC begrensinger i analysetid og effektivitet [49].

2.5.3 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

UHPLC instrumentet er utviklet fra tradisjonell væskrokromatografi HPLC. Kromatografisk prinsipp for UHPLC er lik prinsippet for HPLC. Hovedforskjellen er at kortere kolonner (3-5 cm) med mindre partikkelstørrelse (1,5-2 μm) benyttes i UHPLC sammenlignet med HPLC. I følge **formelen 5** er platetall N proporsjonal med kolonnens lengde (L) og omvendt proporsjonal med diameter av pakkematerialet (d_p). Når partikkelstørrelse og kolonnens lengde reduseres tilsvarende vil kolonnene i UHPLC har same effektivitet (platetall, N) som kolonnene i HPLC [49].

Formel 5 [49]:
$$N \propto \frac{L}{d_p}$$

N = platetallet

L = kolonnens lengde

d_p = diameteren av pakkematerialet

Høydeekvivalenten til en teoretisk plate H er et annen uttrykk som benyttes til å uttrykke effektiviteten til en kolonne. En liten H verdi betyr at kolonnen gir smale topper og dermed mindre båndspredning og høy effektivitet. Van Deemters likning (**formel 6**) beskriver forholdet

mellom høydeekvivalenten til en teoretisk plate H (the height equivalent to a theoretical plate, HETP) og mobilfasehastighet (u) og andre parametere som bidrar til analyttens båndspredning i kolonnen, eddydiffusjon (B), diffusjon i mobilfase (A) og massetransport mellom stasjonær- og mobilfase [49].

Formel 6 [49]:
$$H = \frac{A}{u} + B + Cu$$

H = høydeekvivalenten til en teoretisk plate

u = hastigheten til mobilfase

A = diffusjon i mobilfase

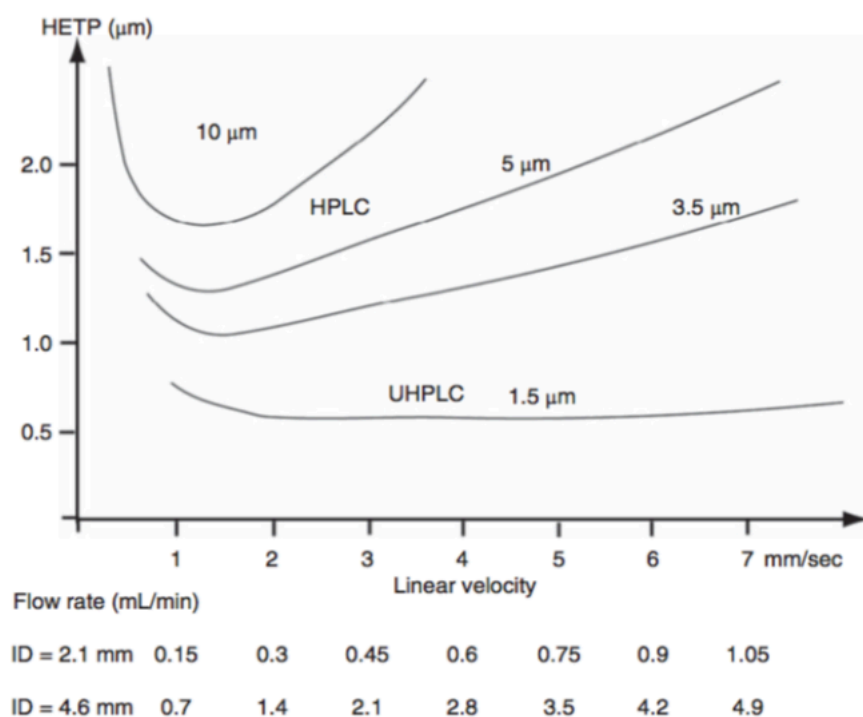
B = eddydiffusjon

C = massetransport mellom stasjonær- og mobilfase

En mer detaljert form for ligningen er beskrevet i **formel 7**, hvor D_m og D_s er diffusjon i henholdsvis mobilfase og stasjonærfase, d_p er partikkelstørrelse og d_m er kapillær diameter (brukes ved åpen tube kapillær og kapillær GC), d_f er tykkelse til stasjonærfase. Ligningen viser at partikkelstørrelse er en viktig parameter som bestemmer kolonnens effektivitet. Platehøyden H vil øke når partikkelstørrelsen reduseres [48].

Formel 7 [48]
$$H = C_e dp + \frac{C_m dp^2 u}{D_m} + \frac{C_d D_m}{u} + \frac{C_{sm} dp^2 u}{D_m} + \frac{C_s d_f^2 u}{D_s}$$

Van Deemter plot beskriver sammenheng mellom høydeekvivalenten til en teoretisk plate H og mobilfasehastigheten u , hvor H er plottet mot u for partikler med ulike partikkelstørrelser. **Figuren 5** viser at kolonne med mindre partikkelstørrelse har bedre separasjonseffektivitet selv ved høy mobilfasehastighet [47]. Ved å benytte korte kolonner med mindre partikkelstørrelse vil både analysetiden og bruk av mobilfase reduseres betydelig sammenlignet med HPLC. UHPLC gir i tillegg bedre separasjon, siden den høye effektivitet (platetall) gir smalere topper og mindre båndspredning. Deteksjonsgrensen blir derfor lavere og prøvevolumene som injiseres ved UHPLC er ofte mindre enn ved HPLC [47, 49].



Figur 5: Van Deemters plott for partikkelstørrelse 10 μ , 5 μ , 3,5 μ og 1,5 μ . Hentet fra [47].

2.6 Massespektrometri (MS)

Analyttene som elueres fra kolonnen detekteres av en detektor, hvor elektrisk respons til analyttene registreres. Datasystemer bearbeider responsen og resultatet rapporteres som et kromatogram, hvor responsen registreres som funksjon av tid etter injeksjon. Responsen skal være proporsjonal med enten massen av stoff i mobilfase eller konsentrasjon av stoff i mobilfase slik at kvantitativ analyse kan utføres basert på måling av topphøyder eller topparealet. De viktigste detektorene som benyttes i legemiddelanalyse er UV-detektor, fluorescensdetektor, elektrokjemisk detektor, brytningsindeksdetektoren og massespektrometri (MS) [50].

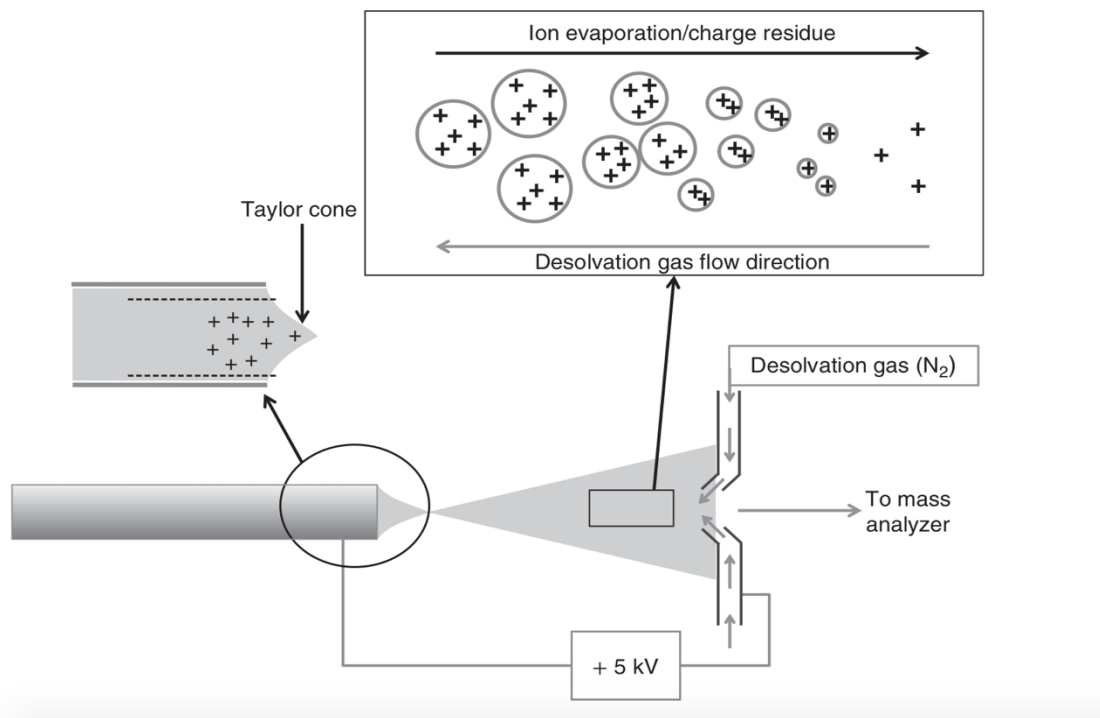
Massespektrometri koblet til et væskechromatografisk system (LC-MS), er en sentral metode for analyse av legemidler i biologiske prøver. Metoden har høy sensitivitet og selektivitet, og i tillegg leverer MS informasjon om molekylær struktur til analytter. MS anvendes dermed både til identifikasjon og kvantitativ bestemmelse innen legemiddelanalyse. Ved LC-MS separeres analyttene først ved passasje gjennom kolonnen i væskechromatografi. Analyttene ioniseres i en ionekilde og ioner føres inn i en masseanalysator. I masseanalysatoren separeres ionene etter forholdet mellom masse og ladning (m/z). En detektor plassert etter masseanalysator registrerer

mengde av ioner ved de ulike massene. En datamaskin behandler resultater som kommer i form av et kromatogram og et massespekter [47]. Kromatogram viser en topp for hvert av de separerte analytter, mens i et massespektrum plottes intensiteten (mengden) av ioner i et stolpediagram som funksjon av m/z . Intensiteten til alle de registrerte ionene sumeres for hvert massespekter. Den totale mengde ioner i hvert massespektrum plottes som funksjon av separasjonstiden og gir et totalt ionestrømskromatogram [50].

2.6.1 Elektroprayionisasjon

De mest anvendte ioniseringsmetodene ved LC-MS er elektroprayionisasjon (*electrospray ionization*, ESI), atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (*atmospheric pressure chemical ionization*, APCI), atmosfæretrykk-foto-ionisering (*atmospheric pressure photo-ionization*, APPI) og induktiv koblet plasma (*inductively coupled plasma*). Hvilken ioniseringsmetode som benyttes bestemmes av polaritet og størrelse til analytter og type analyttersom skal analyseres [47].

I oppgaven ble ESI benyttet som ioniseringsmetode. Elektroprayionisasjon brukes ofte ved ionisering av polare stoffer, inkludert nøytrale, baser og syrer. Ioniseringsprosessen foregår under atmosfæretrykk i ESI. **Figur 6** viser skjematisk presentasjon av ESI og prosess for ionedannelse. Etter separasjon transporteres væskestrømmen med mobilfase og analytter fra UHPLC-kolonnen inn i et trangt kapillærrør som har høy spenning (typisk 2 til 5 kV eller -2 til -5 kV). Væsken er forholdsvis flyktig. Ved utgangen av kapillærrøret vil væskestrømmen blandes med en forstøvergass, nitrogen, slik at en aerosol dannes. Den høye spenningen gir aerosol-dråpene ladninger når de forlater kapillærrøret. En tørkegass introduseres etter utgangen av kapillærrøret som fjerner løsemiddelrester fra væskestrømmen, på veien mot maseanalysator fordampes mobilfasen slik at dråpenes størrelse blir mindre og den frastøtende krefter mellom ionene med like ladning blir større. Når de frastøtende kreftene overskrider overflatespenningen til dråpen sprekker dråpen til flere mindre dråper. De nye dråpene gjennomgår samme prosess. Denne prosessen gjentar seg til det er bare er ioner igjen. Til slutt blir ionene akselerert mot maseanalysatoren ved hjelp av en elektrisk spenning [47].



Figur 6: Skjematisk presentasjon av ESI og dannelse av ioner. Bilde er hentet fra [47].

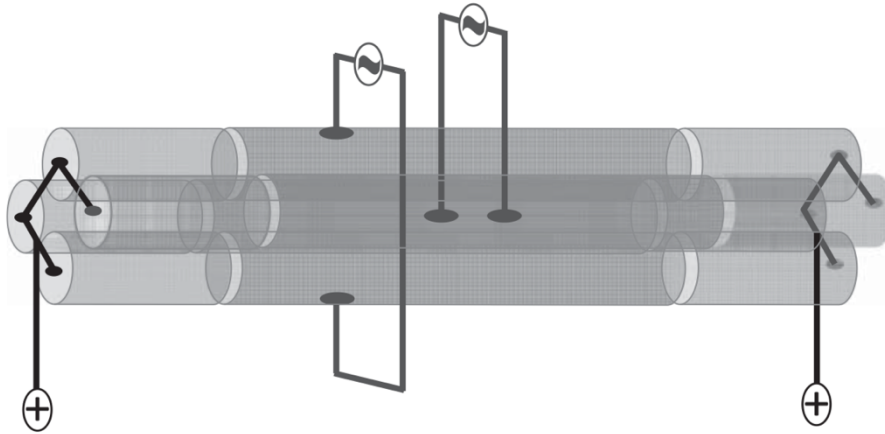
2.6.2 Lineær ionefelle

De mest brukte masseanalytorene innen bioanalytisk LC-MS er kvadrupol, trippel kvadrupol, sylindrisk og lineær ionefelle, time-of-flight, orbitrap og magnetisk sektor. Lineær ionefelle benyttes som masseanalytator i denne oppgaven.

Separasjonsprinsippet til lineær ionefelle er basert på ioners evne til å bevege seg i en sirkulær bane i et elektrisk felt. Masseanalytoren består av tre elektroder, hvor hver elektrode består av fire sylindriske staver. De to ytterste elektrodene er koblet til en direkte spenning med lik polaritet slik at et elektrisk felt dannes i den elektrodene som ligger i midten. Ioner som transporterte fra ionekilden fanges i elektriske feltet. Ved å endre spenningen kan uønskete ioner med gitt m/z bringes ut av den stabile banen og ioner vil forlate ionefellen. Ioner med ønsket m/z blir igjen i ionefellen og vil treffe detektoren [47].

Ved LC-MS akselereres ønsket ion i ionefellen til det får høy nok energi til å danne fragmenter ved kollisjon med helium inne i fellen (*collision induced dissociation*, CID). Alle fragmenter samles i ionefellen og analyseres. I ionefellen skjer alle trinn; valg av masse, fragmentering og deteksjon i sammen sted i analysatoren, men til forskjellige tidspunkter. Selekterte

fragmentioner kan skannes i ulike moduser som *product ion scan*, *precursor ion scan*, *constant neutral loss*, *single reaction monitoring (SRM)* og *multiple reaction monitoring (MRM)* [47]. SRM-modusen ble benyttet i oppgaven. I SRM vil bare et eller flere spesifikke fragmenter fra selektert ion måles. SRM har høy selektivitet slik at lavere deteksjonsgrense kan oppnås [47].



Figur 7: Skjematisk illustrasjon av lineær ionefelle. Bildet er hentet fra [47].

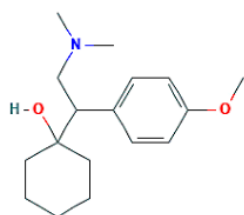
3 Eksperimentelt

3.1 Karakteristikk av analytter

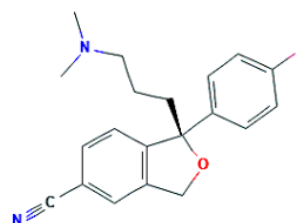
De fysikalsk-kjemiske egenskapene til analyttene er oppsummert i **tabell 3.1**. Analyttenes, metabolittenes og internstandardenes kjemiske strukturer er vist i **figur 8**, **figur 9** og **figur 10**

Tabell 3.1 Analyttenes og metabolittenes fysikalsk-kjemiske egenskaper

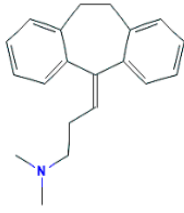
Analytt	Molekylformel [51]	pKa [51]	Log P [51]	Molekylvekt (g/mol) [51]	Proteinbinding [52]
Amitriptylin	C ₂₀ H ₂₃ N	9,76	4,92	277,40	92±2 %
Ariprazol	C ₂₃ H ₂₇ Cl ₂ N ₃ O ₂	7,46	4,55	448,39	> 99 %
Dehydroaripiprazol	C ₂₃ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₂	7,46	4,98	446,40	-
Desmetylcitalopram	C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O	10,54	3,38	310,37	-
Escitalopram	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	9,80	3,74	324,39	80 %
Klorprotiksen	C ₁₈ H ₁₈ ClNS	9,76	5,07	315,86	> 99 %
Kvetiapin	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	7,46	3,17	383,51	83 %
N-desalkylkvetiapin	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ S	8,83	3,16	295,41	-
Nortriptylin	C ₁₉ H ₂₁ N	10,47	4,51	263,38	92±2 %
O-desmetylvenlafaksin	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	9,45	2,72	263,37	27±2
Venlafaksin	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	10,09	3,20	277,25	27±2



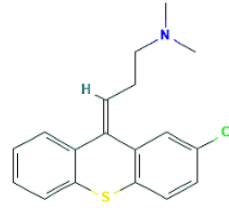
Venlafaksin



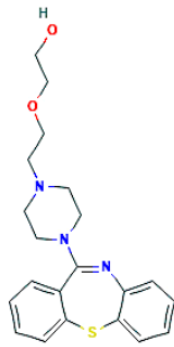
Escitalopram



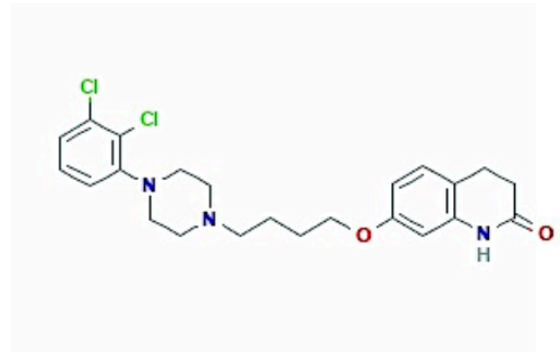
Amitriptylin



Klorprotiksen

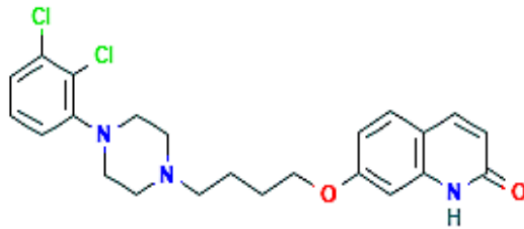


Kvetiapin

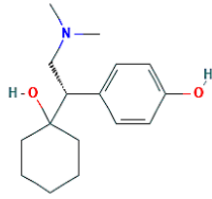


Aripiprazol

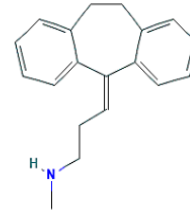
Figur 8: Kjemiske strukturer til analyttene [53]



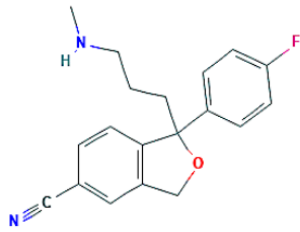
Dehydroaripiprazol



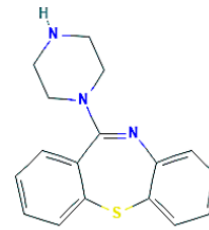
O-desmetylenlafaksin



Nortriptylin

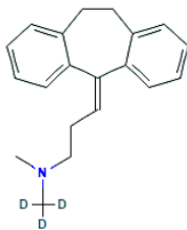


Desmetylcitalopram

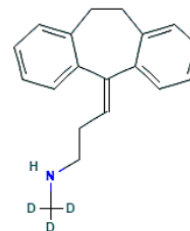


N-desalkylkvetiapin

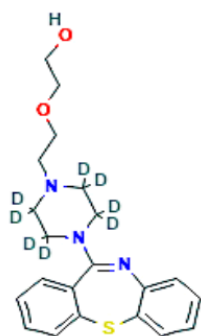
Figur 9: Kjemiske strukturer til metabolittene [53]



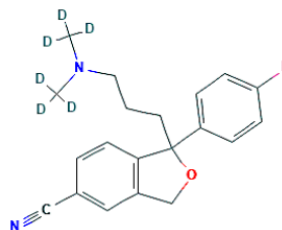
Amitriptylin d3



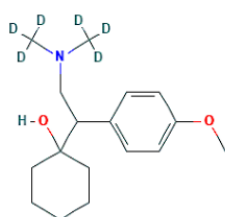
Nortriptylin d3



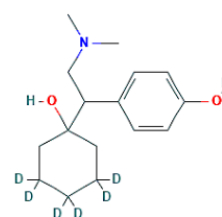
Kvetiapine d8



Citalopram d6



Venlafaksin d6



O-desmetyl venlafaksin d6

Figur 10: Kjemiske strukturer til internstandardene [53]

3.2 Kjemikalier

Tabell 3.2-3 sammenfatter analyttene og internstandardene som ble brukt i oppgaven. Øvrige kjemikalier brukes i ekstraksjonsoppsettet er listet i tabell 3.4

Tabell 3.2 Analyttene og metabolitter

Analytt	Renhet (%)	Produsent	By,land
Amitriptylin	98	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Aripiprazol	99,7	Lipomed-	Arlesheim, Sveits-
Dehydroaripiprazol	-	Synthetica AS	Oslo, Norge
Desmetylcitalopram	-	Lundbeck	København, Danmark
Escitalopram	≥ 98	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Klorprotiksen	≤ 100	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Kvetiapin	≥ 99	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

N-desalkylkvetiapiin	98	Toronto Research Chemicals Inc	North York, Ontario, Canada
Nortriptylin	≥ 98	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
O-Desmetylvenlafaksin	≥ 98,5	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Venlafaksin	-	Chiron	Trondheim, Norge

Tabell 3.3 Internstandarder

Internstandard	Produsent	By, land
Amitriptylin d3	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Citalopram d6	Cerilliant	Round Rock, TX, USA
Kvetiapiin d8	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Nortriptylin d3	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
O-Desmetylvenlafaksin d6	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Venlafaksin d6	Chiron	Trondheim, Norge

Tabell 3.4 Diverse kjemikalier

Kjemikalie	Renhet (%)	Produsent	By, land
Dimetylsulfoksid	≥ 99,9	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Dodecylacetat	97	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Maursyre	98	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Metanol	Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
MilliQ-vann	MilliQ; Ultrapure type 1	Millipore	Molsheim, Frankrike
Natriumhydroksid	99,3	VWR	Radnor, PA, USA
Natriumbikarbonat	≥ 99,5	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Natriumkarbonat	≥ 99,9	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Trifluoreddiksyre	≥ 99	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Trioktylamin	-	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA

3.3 Utstyr

Tabell 3.5-3-6 sammenfatter utstyr og forbruksmaterialer som ble brukt i oppgaven.

Tabell 3.5 Utstyr brukt til PALME-oppsettet

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Akseptorplate med topplokk (Topplate)	MAIPN4550 96-well MultiScreen-IP Filter Plate, med polyvinylidene fluorid (PVDF) membran, 0,45 µm porestørrelse, klar, ikke steril	Millipore	Darmstadt, Tyskland
Aluminiumfolie (Forseglingsfilm)	Thermowell™ Sealing Tape For 96 Well plates	Corning	Kennebunk, Me, USA
Donorplate (Bunnplate)	96 Well Plates, 0,5 ml brønner, polypropylene	Agilent	Santa Clara, Ca, USA

Tabell 3.6 Diverse utstyr og forbruksmaterialer

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Analysevekt	Mettler AE200	Mettler Todelo	Oslo, Norge
Dramsglass og korker	Diverse størrelser	-	-
Eppendorfrør	Protein LoBind Tube, 0,5-1,5 ml	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Glassvialer	1,5 ml short Thread vial, 32x6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Inserts til vialer	Micro-Insert, 0,21 ml, clear glass 15 mm, top	VWR	Radnor, Pa, USA
Korker til vialer	-	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
Mekanisk pipette	0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1-5 ml	Sartorius	Göttingen, Tyskland

Sartorius Biohit pipetter	mLINE®: m20, m200, m1000, m5000	Sartorius	Göttingen, Tyskland
Pipettespisser uten filte	Optifit refill tips 200, 350, 1000 µl	Sartorius	Göttingen, Tyskland
pH meter	744 pH meter	Metrohm	Herisau, Sveist
Ristemaskin	Vibramax 100	Heidolph	Schwabach, Tyskland
Vortexmixer	MS3 digital	IKA	Wilmington, NC, USA
VAMS	20 µL Mitra Microsampler 4-sampler Clamshell	Neoteryx, LLC	Torrance, CA, USA

3.4 Løsninger

3.4.1 Stamløsninger

Alle stamløsninger til analytter, med unntak av aripiprazol, ble laget på FI ved å løse tørrstoff i metanol. Alle stamløsningene ble oppbevart i kjøleskap ved 2-8 °C. Stamløsning av aripiprazol i ACN var ferdiglaget fra Oslo Universitetssykehus (OUS). For escitalopram ble stamløsning laget ved å fortynne 1,59 mg til 1 ml metanol til en konsentrasjon på 1,59 mg/ml. Stamløsning til andre analytter ble laget ved å løse 10 mg tørrstoff i 10 ml metanol, til en konsentrasjon på 1 mg/ml.

Alle stamløsninger av metabolitter, bortsett fra O-desmetylvénlafaksin, var tilgjengelig fra Senter for psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus (SFP). Stamløsning av O-desmetylvénlafaksin i konsentrasjon 1 mg/ml ble laget ved å løse 10 mg tørrstoff i 10 ml metanol.

Tabell 3.7 gir oversikt over konsentrasjon av både analytter og metabolitter i stamløsninger.

Tabell 3.7 Konsentrasjon (mg/ml) av forbindelser i stamløsninger

	Forbindelse	Konsentrasjon(mg/ml)
Analytter	Amitriptylin	1,0
	Aripiprazol	0,64
	Escitalopram	1,59
	Klorprotiksen	1,0
	Kvetiapin	1,0
Metabolitter	Dehydroaripiprazol	0,22
	Desmetylcitalopram	0,09
	N-desalkylkvetiapin	0,14
	Nortriptylin	1,0
	O-desmetylvenlafaksin	1,0

3.4.2 Arbeidsløsning

Arbeidsløsning 1: Arbeidsløsningen hadde en konsentrasjon på 100 µg/ml. Arbeidsløsning ble laget ved å fortynne stamløsninger av amitriptylin, kvetiapin, nortriptylin, O-desmetylvenlafaksin og venlafaksin i MeOH:MQ vann (20%:80%, v/v). Arbeidsløsningen ble løst i blandingen av MeOH og MQ vann for å forbedre løselighet av forbindelsene.

Arbeidsløsning 2: Stamløsninger av aripiprazol, amitriptylin, kvetiapin, nortriptylin, O-desmetylvenlafaksin og venlafaksin ble fortynnet i MeOH til 100 µg/ml.

Arbeidsløsning 3: Stamløsninger av alle analyttene og O-desmetylvenlafaksin ble blandet i metanol med en endelig konsentrasjon på 50 µg/ml.

Arbeidsløsning 4: Arbeidsløsningen ble laget ved å fortynne stamløsninger til alle analyttene og metabolittene i metanol til en konsentrasjon på 20 µg/ml.

Arbeidsløsningene ble videre laget ved å fortynne med henholdsvis MQ-vann, 0,1 M karbonatbikarbonatbuffer, 20 mM maursyre, 40 mM NaOH og fullblod til ønskede konsentrasjoner i forsøkene. Arbeidsløsningene ble oppbevart i kjøleskap ved temperatur 2-8 °C.

3.4.3 Prøveløsninger

Prøveløsning 1 til innledende forsøk fra vandige løsninger og fullblodsprøve:

Prøveløsningen hadde konsentrasjon på 1 µg/ml. Prøveløsningen ble laget ved å fortynne 50 µl av arbeidsløsning 1 i MeOH:MQ-vann (20%:80%, v/v) til 5 ml.

Prøveløsninger til innledende forsøk for sammenligning mellom plasma og fullblod og for optimalisering av ekstraksjonsparametere fra fullblodsprøver:

Det ble laget tre prøveløsninger. Prøveløsning 2 ble laget ved å fortynne 50 µl av arbeidsløsningen 2 i MQ-vann til 5 ml. Prøveløsning 3 ble laget ved å fortynne 50 µl av arbeidsløsningen 2 i 0,1 M karbonatbikarbonatbuffer til 5 ml. Prøveløsningene hadde konsentrasjon på 1 µg/ml. Prøveløsning 4 ble laget i to trinn. Først ble en mellomløsning, som hadde konsentrasjon på 10 µg/ml, laget ved å fortynne 200 µL av arbeidsløsningen 2 i MQ-vann til 2000 µl; 500 µl av mellomløsningen ble videre fortynnet med MQ-vann til 1000 µl, slik at prøveløsning 4 hadde konsentrasjon på 5 µg/ml.

Fullblodsprøveløsninger til forsøk for optimalisering av ekstraksjonsparametere fra

VAMS: Prøveløsningene hadde konsentrasjon på 0,5 µg/ml og ble laget ved å fortynne henholdsvis arbeidsløsning 3 og 4 med EDTA-blod.

3.4.4 Eksternstandarder

I forsøkene ble eksternstandardene brukt for bestemmelse av prosesseffektivitet (PE), utbytte og matrikseffekt.

Til bestemmelse av prosesseffektivitet og matrikseffekt:

Eksternstandarder ble laget ved å fortynne arbeidsløsningene til ønsket konsentrasjon. I alle forsøk ble eksternstandarder laget i 20 mM maursyre, bortsett fra forsøket for optimalisering av akseptorfase. I dette forsøket ble eksternstander laget i henholdsvis 100 % maursyre, 25 % DMSO i maursyre (v/v), 50% DMSO i maursyre (v/v), 75% DMSO i maursyre (v/v), 100 % 20mM TFA, 25 % DMSO i 20 mM TFA (v/v), 50% DMSO i 20 mM TFA (v/v), 75% DMSO i 20 mM TFA (v/v).

Til bestemmelse av ekstraksjonsutbytte: Eksternstandarder ble laget av ekstrahert blank prøve (enten av fullblod eller fullblod absorbert i VAMS). Til ekstraktet ble analytt og internstandard tilsatt til ønskede konsentrasjoner.

3.4.5 Standarder til innledende forsøk i fullblod

En fortynningsrekke bestående av åtte standarder ble laget fra arbeidsløsning 3 i MQ-vann i optimaliseringsforsøk fra fullblodsprøver. Standardene hadde et konsentrasjonsområde fra 10 ng/ml til 2000 ng/ml. Konsentrasjonsområdet var basert på referanseområder til analyttene fra SFP (vedlegg 1). Konsentrasjonen av kalibratorene er gitt i **tabell 3.8**

Tabell 3.8 Konsentrasjon av kalibratorer

Standard	1	2	3	4	5	6	7	8
Konsentrasjon (ng/ml)	10	25	50	100	250	500	1000	2000

3.4.6 Standarder og kontroller til metodevalidering

Standarder og kontroller ble laget ved å fortynne arbeidsløsningen 4 med MQ-vann til ønskede konsentrasjonsnivåer. Standarder i fullblod ble brukt til å bestemme kalibreringskurver for analyttene, mens kontroller ble benyttet til bestemmelse av nøyaktighet og presisjon i metodevalideringen.

Standardene og kontrollene i fullblod ble laget ved å fortynne standardene og kontrollene 10 ganger med fullblod. Konsentrasjon av analyttene i standarder og kontroller i blod er oppgitt i **tabell 3.9 og 3.10**

Tabell 3.9 Konsentrasjon i standarder i blod

Standard	1	2	3	4	5	6
Konsentrasjon (ng/ml)	10	30	100	250	750	2000

Tabell 3.10 Konsentrasjon i kontroller i blod

Kontroll	1	2	3	4
Konsentrasjon (ng/ml)	12	50	300	1500

3.4.7 Internstandardløsninger

Internstandardløsning 1: Løsningen ble laget ved å fortynne 7,5 µg/ml internstandardløsning, som bestod av kvetiapin d8, venlafaksin d6, O-desmetylvenlafaksin d6, amitriptylin d3 og nortriptylin d3 til 1,875 µg/ml i MQ-vann.

Internstandardløsning 2: Løsningen ble laget ved å fortynne stamløsning av henholdsvis kvetiapin d8, o-desmetylvenlafaksin d6, amitriptylin d3, nortriptylin d3 og citalopram d6 til konsentrasjon på 2 µg/ml i MeOH.

Internstandardløsning 3: Løsningen ble laget ved å fortynne stamløsning av henholdsvis iikvetiapin d8, venlafaksin d6, o-desmetylvenlafaksin d6, amitriptylin d3, nortriptylin d3 og citalopram d6 til konsentrasjon på 2µg/ml i MeOH.

Internstandardløsning 4: Løsningen ble laget ved å fortynne 500 µl internstandardløsning 3 med MQ vann til 2000 µl. Konsentrasjon var på 0,5 µg/ml.

3.4.8 Fullblod

Både frosset fullblod og ferskt fullblod ble brukt som matriks i forsøkene. Frosset blod ble levert fra blodbanken ved Ullevål sykehus og ble oppbevart ved – 20°C. Frosset blod ble tint før bruk. Ferskt blod ble tappet fra forskjellige blodgivere i EDTA-rør, EDTA-blod. EDTA-blod er fullblod med antikoagulant. EDTA-blod ble oppbevart ved 2-8 °C i 14 dager. EDTA-blod ble fortynnet med henholdsvis stamløsninger, standarder og kontroller, og ble videre tilsatt til VAMS.

3.4.9 Diverse løsninger

Donorløsning

40 mM NaOH: Først ble det laget 1 M NaOH løsning ved å løse 1998,5 mg NaOH i MQ-vann til 50 ml. Fra 1 M NaOH-løsningen ble 2 mL fortynnet i MQ-vann til 50 ml i en målekolbe. pH til løsningen var 12 ved måling med pH-strips.

0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og pH 9,3 var tilgjengelig på FI.

Organisk væskemembran

1% trioktylamin i dodecylacetat (w/w): Løsningen ble laget ved å blande sammen 10 mg trioktylamin og 990 mg dodecylacetat.

5% trioktylamin i dodecylacetat (w/w): Løsningen ble laget ved å blande sammen 50 mg trioktylamin og 950 mg dodecylacetat.

10% trioktylamin i dodecylacetat (w/w): Løsningen ble laget ved å blande sammen 100 mg trioktylamin og 900 mg dodecylacetat.

Akseptorløsning

20 mM HCOOH: 774 μ l maursyre ble fortynnet med MQ-vann til 1000 ml. Løsningens pH var 3 ved måling med pH-strips

25 % DMSO i 20 mM HCOOH (v/v): Løsningen ble laget ved å blande 250 μ l DMSO med 750 μ l 20 mM HCOOH. Totalt volum var 1000 μ l.

50 % DMSO i 20 mM HCOOH (v/v): Løsningen ble laget ved å blande 500 μ l DMSO med 500 μ l 20 mM HCOOH. Totalt volum var 1000 μ l.

75 % DMSO i 20 mM HCOOH (v/v): Løsningen ble laget ved å blande 750 μ l DMSO med 250 μ l 20 mM HCOOH. Totalt volum var 1000 μ l.

20 mM TFA: Løsningen ble laget ved å fortynne 153,8 μ l av 1300 mM TFA løsning i MQ-vann til 10 ml i en målekolbe.

25 % DMSO i 20mM TFA (v/v): løsningen ble laget ved å blande 250 µl DMSO med 750 µl 20 mM TFA. Totalt volum var 1000 µl.

50 % DMSO i 20 mM TFA (v/v): løsningen ble laget ved å blande 500 µl DMSO med 500 µl 20 mM TFA. Totalt volum var 1000 µl.

75 % DMSO i 20 mM TFA (v/v): Løsningen ble laget ved å blande 750 µl DMSO med 250 µl 20 mM TFA. Totalt volum var 1000 µl.

3.4.10 Mobilfaser

Mobilfase A (95% 20 mM maursyre:5% metanol, v/v) ble laget ved å blande 950 ml 20mM maursyre i MQ vann med 50 ml metanol.

Mobilfase B (95% MeOH: 5% 20 mM maursyre) ble laget ved å blande 950 ml metanol med 50 ml 20 mM maursyre i MQ-vann.

3.5 Instrumentelle betingelser

I forsøkene ble et UHPLC-MS/MS-instrumentet med lineær ionefelle som masseanalysator brukt for analysene. Alle forsøkene og metodevalidering ble gjort på instrumentet på Seksjon for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo. Serie 2 på metodevalideringen ble også utført på et -MS/MS-instrument med trippel kvadupol (Q) som masseanalysator som var tilgjengelig ved OUS.

3.5.1 Væskekromatografi (UHPLC betingelser)

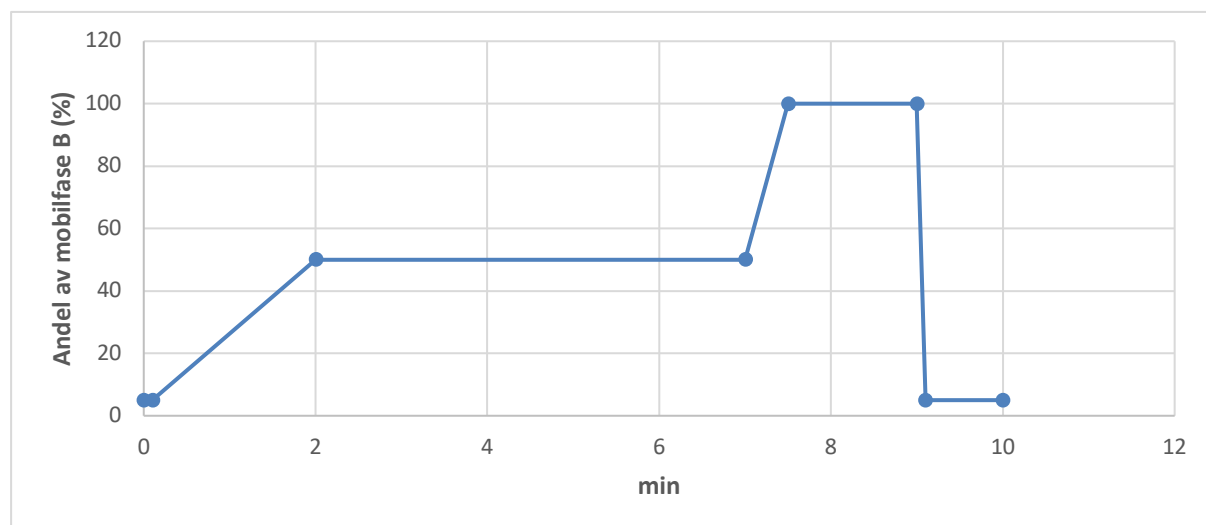
UHPLC-instrumentet brukt for væskekromatografi var et Dionex UltiMate 3000 RS system fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA). Systemet bestod av Dionex UltiMate 3000 WPS TRS autosampler, HPG 3400 RS pumpe, TCC 3000 RS kolonneovn og RSD 3600 degasser. Kromatografisk separasjon av analyttene ble utført på en Aquity UPLC® HSS T3 kolonne fra Waters (Wexford, Irland). Den indre diameteren var på 2,1 mm og lengde var 100 mm. Partikkelstørrelse var 1,8 µm og porestørrelse var 100 Å.

Mobilsammensetning bestod av mobil fase A (5% metanol og 95% 20 mM maursyre i MQ-vann (v/v)) og mobilfase B (95% metanol og 5% 20 mM maursyre i MQ-vann (v/v)). Total

analysetid var 10 minutter og kolonnen hadde en konstant temperatur på 60 °C. Injeksjonsvolumet ble satt til 2 µl ved optimaliseringsforsøk og 5 µl ved metodevalidering. Elueringsgradienten er vist i tabell 3.11 og figur 11.

Tabell 3.11 Mobilfasens gradient for separasjon av analyttene

Retensjonstid (min)	Mobilfase A (%)	Mobilfase B (%)	Mobilfasehastighet (ml/min)
0,00	95	5	0,4
0,10	95	5	0,4
2,00	50	50	0,4
7,00	50	50	0,4
7,50	0	100	0,4
9,00	0	100	0,4
9,10	95	5	0,4
10	95	5	0,4



Figur 11: Grafisk fremstilling av elueringsgradient

3.5.2 Massespektrometri (MS betingelser)

Optimalisering av MS/MS

Programmet LTQ Tune Plus fra Thermo Scientific ble brukt for optimalisering av MS-parametere. Løsning av analytt med konsentrasjon 1 µg/ml i MeOH ble injisert (10 µl/min) direkte inn i massespektrometeret ved bruk av en T-kobling og sprøytepumpe, mens mobilfase

(5 % mobilfase B, 300 µl/min) ble pumpet gjennom systemet. Til hver enkelt analytt ble kollisjonsenergien først optimalisert, deretter ble det bestemt hvilke fragmentioner som ga best signalintensitet. Kollisjonsenergien ble justert slik at signal til moderionet er 10-15% av signal til det beste fragmentionet. Tune Plus programmet utførte en automatisk optimalisering av kapillærtemperatur, kapillærspenning og andre instrumentelle parametere. Denne prosedyren ble gjentatt for hver av analyttene, metabolittene og internstandardene. Sprøytepumpen ble skylt med metanol mellom hver tuning.

MS/MS betingelser

Elektrosprayionisasjon med positiv ionisering ble brukt til ionisering. Kapillærspenningen var 4,5 kV, kapillærtemperatur var 350 °C. Nitrogen ble brukt som forstøvergass (gasstrykk på 26 AU) og tørkegass (gasstrykk på 5 AU). Masseanalysator var en lineær ionefelle og SRM-modus ble brukt for monitorering. Overgangene er delt i seks segmenter basert på retensjonstidene til analyttene, internstandardene og metabolittene. Overgang, kollisjonsenergi (*collision induced dissociation*, CID) er oppgitt i **tabell 3.12-3.16**.

Tabell 3.12 SRM-overganger. Segment 1: 0,00-3,40 min

Forbindelse	Overgang (Da)	CID (%)
O-desmetylvenlafaksin	264,08>246,2	14,5
O-desmetylvenlafaksin d6	270,22>252,2	16

Tabell 3.13 SRM-overganger. Segment 2: 3,40-4,00 min

Forbindelse	Overgang (Da)	CID (%)
Venlafaksin	278,25>260,3	14
Venlafaksin d6	284,20>266,0	12
Escitalopram	325,20>262,0	17,5
Citalopram d6	331,25>262,2	17
Desmetylcitalopram	311,40>262,1	19

Tabell 3.14 SRM-overganger. Segment 3: 4,00-4,50 min

Forbindelse	Overgang (Da)	CID (%)
Kvetiapin	384,17>252,9	14
Kvetiapin d8	392,29>258,2	14
N-desalkylkvetiapin	296,18>253,09	21,5

Tabell 3.15 SRM-overganger. Segment 5: 5,20-6,30 min

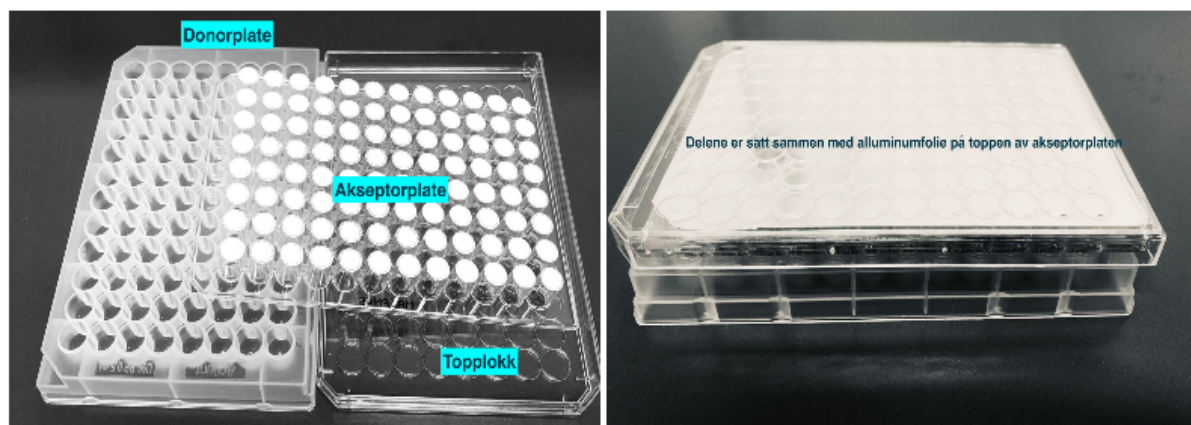
Forbindelse	Overgang (Da)	CID (%)
Amitriptylin	278,25>233,1	19
Amitriptylin d3	281,10>233,0	16
Aripiprazol	450,00>287,0	15
Dehydroaripiprazol	447,22>286,1	18
Nortriptylin	264,17>233,2	17
Nortriptylin d3	267,10>233,0	14

Tabell 3.16 SRM-overganger. Segment 6: 6,30-10 min

Forbindelse	Overgang (Da)	CID (%)
Kloproktiksen	316,10>271,1	18

3.6 Utførelse av PALME

PALME-oppsettet består av en 96-brønns bunnplate (donorplate) og en korresponderende 96 brønns filteplate, laget av porøst PVDF-materiale. Det ble satt på en aluminiumsfilmen og et topplokk for å hindre fordamping, se **Tabell 3.5**. De ulike delene av oppsettet er avbildet i **figur 12**.



Figur 12: PALME-oppsett. Oppsettet består av donorplate, akseptorplate som er snudd opp ned og topplokk.

Det ble utført ekstraksjon av analyttene fra vandige prøveløsninger, prøveløsninger i fullblod og VAMS, og fra reelle prøver fra pasienter. Både ekstraksjonsbetingelser i donorfase, akseptorfase og SLM ble optimalisert. De betingelsene som gav optimal prosesseffektivitet ble brukt videre i optimaliseringsforsøk der PALME ble utført fra VAMS, i metodevalidering og analyse av reelle prøver. Fremgangsmåtene for ekstraksjon av fra de ulike prøveløsningene er beskrevet i punktene nedenfor.

3.6.1 PALME fra vandige prøveløsninger

Først ble prøveløsning 1 (konsentrasjon på 1 $\mu\text{g/ml}$) overført til hver brønn i donorplaten. Prøveløsningen ble fortynnet enten i 40 mM NaOH-løsning eller i 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer tilsatt MeOH. Både NaOH-løsningen og karbonat-bikarbonatbufferen gjorde at prøveløsningen ble basisk. Blankprøve ble laget med henholdsvis 40 mM NaOH og karbonat-bikarbonatbuffer.

Dodecylacetat med tilsetning av trioktylamin i ulike konsentrasjoner ble brukt som organisk væskemembran. Filtermembran vendte opp ved å snu akseptorplaten opp-ned. Organisk

væskemembranen ble avsatt på filteret med pipette i ulike volum (3-4 µl). Etter få sekunder ble SLM dannet og akseptorplaten ble vendt tilbake. En volum av akseptorløsning på 50 µl ble overført til akseptorbrønnen. Donor og akseptor-platene ble klempt sammen.

En aluminiumfolie ble klistret på toppen av akseptorplaten og topplokk ble satt på PALME-oppsettet ble festet på en ristemaskin, og hastigheten til maskinen ble satt på 900 rpm. Ekstraksjonstiden var 60 minutter. **Tabell 3.17** gir en oversikt over ekstraksjonsbetingelsene for PALME fra vandige prøveløsninger.

Tabell 3.17 Ekstraksjonsbetingelser for ekstraksjon av vandige løsninger

Donorfase	SLM	Akseptor fase	Ekstraksjonstid og hastighet
<ul style="list-style-type: none"> • 125 µl prøveløsning 1 • 125µl 40mM NaOH 	4 µl 1% TOA	50 µl 20mM maursyre	<ul style="list-style-type: none"> • 60 minutter • 900 rpm
	4 µl 5% TOA		
	4 µl 10% TOA		
<ul style="list-style-type: none"> • 100 µl prøveløsning 1 • 100 µl MQ-vann • 25 µl 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer • 25 µl MeOH 	3 µl 1% TOA		
	3 µl 10% TOA		

Etter ekstraksjonen ble ekstraktene fra akseptorplaten umiddelbart overført til glassvialer slik at videre ekstraksjon ble stoppet og eventuell tilbake-ekstraksjon ble hindret. Ekstraktene ble analysert direkte på UHPLC-MS/MS siden akseptorløsningen er kompatibel med mobilfase og instrumentet.

3.6.2 PALME fra fullblod og plasma

Prøveløsninger ble fortynnet direkte med ren fullblod og ren plasma i donorbrønner. I de første forsøkene ble det brukt 100 µl av enten fullblod eller plasma. Volumet ble redusert til 20 µl i de etterfølgende forsøkene da dette var det volumet VAMS kunne ta opp. Basisk donorløsning ble også tilsatt i donorbrønnene. Internstandard ble tilsatt i donorbrønnene ved tillaging av kalibreringskurver for analyttene. Totalvolum i hver donorbrønn ble justert til 250 µl for hver enkelt ekstraksjon.

Organisk væskemembran ble formet på samme framgangsmåte som ved PALME fra vandige prøveløsninger. Det ble tilsatt 50 µl av ulike akseptorløsninger i donorbrønner. Ekstraksjon ble fremmet av en ristemaskin i likhet med vandige løsninger, fortsatt med en ristehastighet på 900 rpm, men med ulike ekstraksjonstider på henholdsvis 60 og 90 minutter.

3.6.3 PALME fra VAMS, reelle prøver og metodevalidering

Fullblodprøveløsning ble laget fra arbeidsløsning 3 ved å fortynne standarder og kontroller i fullblod slik som forklart i henholdsvis **avsnitt 3.4.3 og 3.4.6**. VAMS ble deretter dyppet i fullblod. VAMS ble lufttørket i minimum tre timer før tilsetning av 20 µl internstandard på tippet av VAMS. På reelle prøver var VAMS dyppet i blod fra pasienter når de ble utlevert fra Diakonhjemmet. Dermed ble kun 20 µl internstandard tilsatt på VAMS. VAMS med internstandard ble lufttørket i minimum 3 timer. Ved bestemmelse av utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt ble internstandard tilsatt etter ekstraksjon.

VAMS ble overført til donorbrønner ved bruk av en pinsett. Deretter ble donorløsning tilsatt i brønnene. 10 % TOA i DDA var brukt som organisk væskemembran. Akseptorløsning var 50 µl av 20mM maursyre var. Ekstraksjonstiden ble variert fra 30 til 150 minutter med en ristehastighet på 900 rpm. Ekstrakter ble overført til vialer og analysert direkte i UHPLC-MS/MS.

3.7 Innledende forsøk

I de innledende forsøkene ble ekstraksjonsparameterene for ekstraksjon av psykofarmaka fra vandige prøveløsninger og fullblod optimalisert. Ulike ekstraksjonsbetingelser i donorfase, væskemembran og akseptorfase ble undersøkt i forsøkene. De betingelsene som ga optimal prosesseffektivitet ble brukt videre til ekstraksjon av analyttene fra VAMS.

3.7.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger

I optimaliseringsforsøkene ble det benyttet en prøveløsning med konsentrasjon på 1 µg/ml som inneholdt et utvalg av psykofarmaka: amitriptylin, nortriptylin (også metabolitt av amitriptylin), venlafaksin, kvetiapin og fluoksetin samt metabolittene norfluoksetin og o-desmetylvenlafaksin To ulike donorløsninger og ulike volum og konsentrasjon av organisk væskemembran

ble testet i forsøket som var basert på tidligere arbeider [38, 54]. **Tabell 3.17** omfatter ulike ekstraksjonsparametere fra vandige løsninger. For hver enkelt forbindelse ble prosesseffektivitet (PE) og presisjon (RSD) bestemt.

3.7.2 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra fullblodprøver

Ekstraksjonsbetingelsene som ble benyttet var basert på innledende forsøk fra vandige løsninger. I to forsøk ble 40 mM NaOH brukt som donorløsning, og 4 µl av henholdsvis 1 % TOA i DDA og 10 % TOA i DDA ble brukt som organisk væskemembran. I de to ytterligere forsøkene ble 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer brukt som donorløsning, MeOH ble tilsatt for å blokkere adsorpsjon av forbindelsene til veggen av donorbrønnen [44]. I likhet med de to andre betingelsene ble 1 % TOA i DDA og 10 % TOA i DDA brukt som organisk væskemembran, men volumet var 3 µl. Totalvolum i donorfase var 250 µl. Ekstraksjonsbetingelsene er oppsummert i **tabell 3.18**

Tabell 3.18 Ekstraksjonsbetingelser for test av ulike donorløsninger og organiske væskemembraner

Donorfase	SLM	Akseptorfase
<ul style="list-style-type: none"> • 25 µl prøveløsning 2 • 100 µl fullblod • 125 µl 40mM NaOH 	4 µl 1% TOA	50 µl 20mM maursyre
	4 µl 10 % TOA	
<ul style="list-style-type: none"> • 25 µl prøveløsning 3 • 100 µl fullblod • 100 µl 0,1 M karbonat-bikarbonabuffer • 25 µl MeOH 	3 µl 1 % TOA	
	3 µl 10 % TOA	

Sammenlikning av PALME med fullblod og plasma

Det er også undersøkt ekstraksjon fra fullblod og plasma med samme ekstraksjonsbetingelser. Karbonat-bikarbonatbuffer ble brukt som donorløsning, mens SLM besto av 3 µl 10% TOA og akseptorløsning var maursyre. Prosesseffektivitet (PE) ble brukt for å sammenligne forskjell

mellom fullblod og plasma som biologiske prøveløsninger. Ekstraksjonsbetingelsene er gitt i **tabell 3.19**

Tabell 3.19: Ekstraksjonsbetingelser ved PALME med prøveløsninger av fullblod og plasma

Donorfase	SLM	Akseptorfase
<ul style="list-style-type: none"> • 25 µl prøveløsning 3 • 100 µl fullblod/plasma • 100 µl 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer • 25 µl MeOH 	3 µl 10 % TOA	50 µl 20mM maursyre

Akseptorløsning

20 mM maursyre ble brukt som akseptorløsning i optimaliseringsforsøkene basert på tidligere erfaringer. Det ble testet om andre akseptorløsninger ville gi høyere PE og bedre RSD sammenlignet med 20mM maursyre. Åtte akseptorløsninger med ulike sammensetninger ble undersøkt i forsøket. Prosesseffektivitet ble sammenlignet etter ekstraksjon for å bestemme optimal akseptorløsning for ekstraksjonsmetoden. I forsøket ble en prøveløsning i fullblod med konsentrasjon på 5 µg/ml brukt. I hver donorbrønn ble 20 µl prøveløsning, 20 µl fullblod, 185 µl av 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer og 25 µl MeOH tilsatt, og 10 % TOA i DDA med et volum på 3 µl ble benyttet som organisk væskemembran. Det ble laget åtte eksterstandarder med konsentrasjoner som tilsvarte 100 % PE i akseptorløsningene for å beregne PE til hver av akseptorløsningene. **Tabell 3.20** oppsummerer sammensetningene som ble undersøkt i forsøket.

Tabell 3.20 Ulike sammensetninger i akseptorfase ved optimaliseringsforsøkene

20mM HCOOH: DMSO	20mM TFA: DMSO
<ul style="list-style-type: none"> • 100:0 (%v/v) • 25:75 (%v/v) • 50:50 (%v/v) • 75:25 (%v/v) 	<ul style="list-style-type: none"> • 100:0 (%v/v) • 25:75 (%v/v) • 50:50 (%v/v) • 75:25 (%v/v)

Linearitet

Fortynningsrekker til prøveløsningene i fullblod bestod av åtte konsentrasjonsnivåer (n=4). Konsentrasjonsområdet var fra 10 til 2000 ng/ml i blod. Fortynningsrekken til eksternstandarder bestod av åtte konsentrasjonsnivåer som tilsvarte 100% PE av prøveløsningene. Eksternstandardene ble injisert direkte i UHPLC-MS/MS uten å bli ekstrahert. Hensikten med å lage standardkurve var å studere linearitet (r^2) til analyttene og sammenhengen mellom PE og analyttkonsentrasjon.

Bestemmelse av utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt

Utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt ble bestemt ut fra to prøveløsninger som hadde konsentrasjonsnivåer på henholdsvis 0,05 µg/ml (n=3) og 0,5 µg/ml (n=4). Forsøksoppsettet bestod av følgende: A: eksternstandarder til prøveløsningene, laget i 20mM maursyre, som tilsvarte 100 % konsentrasjon av analyttene i akseptorløsning; B: Analytt som ble tilsatt i blankt prøve etter ekstraksjon av fullblod; C: analytt som ble tilsatt før ekstraksjon. Internstandard ble tilsatt etter ekstraksjon i både A, B og C. Internstandard ble brukt til å korrigere for endringer under analysen.

For bestemmelse av utbytte ble signalintensitet for prøveløsningene tilsatt før ekstraksjon (C) sammenlignet mot signalintensitet for prøveløsningene tilsatt etter ekstraksjon (B), som tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte. Prosesseffektivitet ble beregnet ved å sammenligne signalintensitet av eksternstandarder (A) og signalintensitet for prøveløsningene tilsatt før ekstraksjon (C). Matrikseffekt ble beregnet ved å sammenligne signalintensitet av eksternstandarder (A) og signalintensitet av blankt fullblod tilsatt analytt etter ekstraksjon (B).

Formel 8 [55]: Ekstraksjonsutbytte = $C/B \times 100 \%$

Formel 9 [55]: Prosesseffektivitet = $C/A \times 100 \%$

Formel 10 [55]: Matrikseffekt = $B/A \times 100 \%$

3.8 Optimalisering av ekstraksjonsparametere til PALME fra VAMS

Inkorporering av internstandard før prøveopparbeidelse

Tilsetning av internstandard på VAMS ble utført med ulike framgangsmåter. I forsøket ble prøveløsning med konsentrasjon 0,5 µg/ml i fullblod benyttet. Forsøksoppsettet bestod av fem sett (n=3):

- Sett 1: VAMS ble først dyppet i prøveløsningen i blod og tørket. Deretter ble 20 µl internstandard tilsatt til tippen. VAMS ble lufttørket før de ble overført til PALME for ekstraksjon.
- Sett 2: VAMS ble først dyppet i prøveløsningen i blod og tørket. Deretter ble 20 µl internstandard tilsatt til tippen. VAMS ble umiddelbar overført til PALME. Ekstraksjon ble utført mens VAMS fortsatt var våt.
- Sett 3: VAMS ble først dyppet i prøveløsningen i blod og tørket. VAMS ble overført til PALME, 20 µl internstandard ble tilsatt i hver donorbrønn og ekstraksjon ble utført.
- Sett 4: Først ble VAMS dyppet i internstandardløsning og tørket. Deretter ble VAMS dyppet i prøveløsningen i blod og tørket før de ble overført til PALME for ekstraksjon.
- Sett 5: VAMS ble dyppet i 0-blod og tørket før de ble overført til PALME. Vandig prøveløsning med konsentrasjon 0,5 µg/ml og 20 µl internstandard ble tilsatt i hver donorbrønn før ekstraksjon.

Sett 5 ble brukt som standard som tilsvarer 100 % overgang av analytt og internstandard fra VAMS til donorfase. Arealforhold mellom analytt og internstandard ble først regnet ut. Deretter ble relativt forhold (relativ respons) mellom arealforhold til sett 5 og arealforhold til hver av de andre settene beregnet. De relative responsene ble sammenlignet med hverandre og den optimalisert framgangsmåten var den som hadde relativ respons på tilnærmet 100 %.

Donorfase

I et forsøk ble karbonat-bikarbonatbuffere med ulik pH på henholdsvis 9,3 og 10,5 testet. For bufferen med pH 10,5 ble det i tillegg testet påvirkning på prosesseffektivitet ved tilsetning av MeOH og DMSO i donorfase. VAMS ble først dyppet i prøveløsning i blod med konsentrasjon 0,5 mg/ml og tørket. Deretter ble internstandard tilsatt til tippet av VAMS, og denne ble tørket. VAMS ble overført til donorbrønn. Ekstraksjon ble utført med ulike betingelser i donorfase. Ekstraksjonsbetingelsene er oppsummert i **tabell 3.21**

Tabell 3.21 Ulike ekstraksjonsbetingelser for optimalisering av donorfase

Sett(n=3)	Donorfase	SLM	Akseptorfase
Sett 1 Buffer pH 10,5 med MeOH	- VAMS -200 μ l 0,1 M karbonat- bikarbonatbuffer pH 10,5 -25 μ l MeOH	3 μ l 10% TOA	50 μ l 20mM maursyre
Sett 2 Buffer pH 10,5 med DMSO	- VAMS -200 μ l 0,1 M karbonat- bikarbonatbuffer pH 10,5 -25 μ l DMSO		
Sett 3 Bare buffer pH 10,5	- VAMS -225 μ l 0,1 M karbonat- bikarbonat buffer pH 10,5		
Sett 4 Bare buffer pH 9,3	- VAMS -225 μ l 0,1 M karbonat- bikarbonatbuffer pH 9,3		

Ekstraksjonstid

Optimal ekstraksjonstid ble bestemt ved å undersøke PE og RSD for signalintensitet til analyttene og metabolittene etter ekstraksjonstider på 30, 60, 90, 120 og 150 minutter. For hver ekstraksjonstid ble det ekstrahert tre paralleller av en konsentrasjon tilsvarende 0,5 μ g/ml i blod samlet med VAMS. En tidskurve ble laget for å studere sammenheng mellom ekstraksjonstid og PE. I tillegg ble ekstraksjonskinetikken for stoffene studert for å bestemme optimal ekstraksjonstid.

Løsningsmiddel for internstandard

I tidligere forsøkt ble internstandard laget i MeOH. Det var mistanke om at tilsatsen av MeOH kunne påvirke desorpsjon av analytt fra VAMS til donorfasen. Dermed ble det undersøkt om påvirkning av MeOH på PE sammenlignet med MQ-vann. Seks VAMS ble dyppet først i prøveløsning i fullblod med konsentrasjon 0,5 µg/ml. VAMS ble tørket før tre av VAMS ble dyppet i MQ-vann og resten dyppet i MeOH. VAMS ble tørket i minst tre timer før de ble overført til PALME.

Sammenligning mellom EDTA-blod og blod fra serumrør uten tilsetning

Det var ønskelig å undersøke mulig forskjell i utbytte, PE og matrikseffekt mellom prøver fra EDTA blod og blod fra serumrør uten tilsetning. Forsøket ble utført på to ulike konsentrasjonsnivåer (kontroll 4 og kontroll 2) fra én bloddonor. Tillaging av prøveløsninger fra blod uten EDTA ble umiddelbart utført rett etter blodtapping på grunn av rask koagulering. Både utbytte, PE og matrikseffekt ble sammenlignet i forsøket.

3.9 Metodevalidering

Metodevalideringen for ekstraksjon av psykofarmaka fra VAMS ble utført etter retningslinjene for bioanalytisk metodevalidering fra *European Medicines Agency (EMA)* og retningslinje for utvikling og validering av metoder basert på dried blood spot (DBS) til TDM [56, 57]. Den sistnevnte retningslinjen fokuserer på analyse av DBS ved bruk av kromatografiske teknikker til kvantitativ bestemmelse av småmolekylære legemidler og deres metabolitter. Følgende parametere ble inkludert i metodevalideringen: overdrag, linearitet, minste detekterbare konsentrasjon (MDK) og minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), presisjon og nøyaktighet, ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt, spesifisitet og effekt av hematokrit-nivå.

Konsentrasjon av standardene og kontrollene brukt under valideringen er oppgitt i **tabell 3.9** og **3.10**. Betingelsene for PALME-prosedyren er beskrevet i **tabell 3.22**.

Tabell 3.22 Ekstraksjonsbetingelse for metodevalidering

Donorfase	SLM	Akseptorfase	Ekstraksjonstid og hastighet
<ul style="list-style-type: none"> • VAMS • 200 µl 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer • 25 µl DMSO 	3 µl 10% TOA	50 µl 20mM maursyre	<ul style="list-style-type: none"> • 900 rpm • 60 min

3.9.1 Presisjon og nøyaktighet

For bestemmelse av nøyaktighet og presisjon ble fire konsentrasjonsnivåer (kontroll 1-4) brukt. Nøyaktighet og presisjon ble undersøkt både for innenserie (repeterbarhet) og mellomserie (reproduserbarhet). Innenserievariasjon ble vurdert ved å ekstrahere seks paralleller av hvert konsentrasjonsnivå. Mellomserievariasjon ble vurdert ved å ekstrahere to paralleller av hvert konsentrasjonsnivå over flere dager. En parallell av standarder (standard 1-6) ble også ekstrahert sammen med konsentrasjonsnivåene på samme dag for å lage kalibreringskurver for analyttene. Kalibreringskurvene ble benyttet for å beregne den målte konsentrasjonen til kontrollene. Den målte konsentrasjonen ble sammenlignet med teoretisk konsentrasjon til hver kontroll.

Nøyaktighet ble uttrykt som relativ feil og beregnet ved å dele differansen mellom målt konsentrasjon ($C_{\text{målt}}$) og teoretisk konsentrasjon (C_t) på teoretisk konsentrasjon med følgende formel:

Formel 11:
$$\text{Relativ feil} = \frac{C_{\text{målt}} - C_t}{C_t} \times 100\%$$

Presisjon ble oppgitt som RSD-verdier, og ble beregnet ved å dele standardavvik mellom målte konsentrasjoner på gjennomsnitt av målte konsentrasjonene med følgende formel:

Formel 12:
$$\text{RSD} = \frac{\text{Standardavvik}}{\text{Gjennomsnitt}} \times 100\%$$

3.9.2 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK)

For å beregne minste detekterbare konsentrasjon (MDK) ble det utført ekstraksjon fra en fortynningsrekke fra standard 1 (n=2). Standard 1 ble fortynnet ned til 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 og 1/40. Fortynning ble laget med fullblod på samme måte som for standarder og kontroller. MDK var den konsentrasjonen som ga et signal-til-støy-forhold (S/N) på minst 3.

3.9.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) var den laveste konsentrasjonen av analytt i prøve, hvor nøyaktigheten og presisjonen oppfylte kravene om relativ feil innenfor $\pm 20\%$ og RSD verdi $\leq 20\%$.

3.9.4 Overdrag

Overdrag (carryover) ble bestemt ved å injisere to ekstrakter fra blankprøver med kun fullblod og internstandard etter kjøring av ekstrakt av standard 6, som har høyest konsentrasjon i standardrekken. Overdraget ble beregnet ved å sammenligne signalintensitetene for blank prøvene og signalintensiteten for den minste kvantifiserbare konsentrasjonen (MKK).

3.9.5 Linearitet

Linearitet ble undersøkt med seks konsentrasjonsnivåer (standard 1-6). Konsentrasjonsnivåene dekket det terapeutiske området til analyttene og var fra 10-2000 ng/mL (n=5). Kalibreringskurver med 1/x vekting for hver analytt ble laget og korrelasjonskoeffisienten (r^2) ble estimert ved bruk av dataprogrammet Xcalibur™. Både kvadratisk og lineær tilpasning av kalibreringskurvene ble undersøkt slik at kurvenes korrelasjonskoeffisienter var tilnærmet 0,99.

3.9.6 Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt

For å undersøke ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt ble Matuszewskis metode benyttet [55]. Til forsøket ble det brukt blod fra fire ulike donorer. To kontrollnivåer ble benyttet for evalueringen (kontroll 4 – høy konsentrasjon og kontroll 2 – lav konsentrasjon). Hematokrit var forventet å påvirke ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt, dermed var det vesentlig å undersøke utbytte og matrikseffekt på ulike hematokrit-nivå, som var laget fra én donor. Fremgangsmåte for tillaging av ulike hematokrit nivå er beskrevet i **avsnitt 3.9.7**. Det

ble tilsammen seks ulike blodprøver: Blod 1 (hematokrit) HT 0,2, 0,4 og 0,6; blod 2, blod 3, og blod 4.

Til forsøket ble det laget tre sett på følgende måter: A: fire paralleller av kontroll (eksternstandarder) laget direkte i 20 mM maursyre, som tilsvarte 100 % konsentrasjon av analyttene i akseptorløsning (100 % PE); B: Analytt tilsatt i ekstraktet fra blankt fullblod fra de seks blodprøvene etter ekstraksjon, konsentrasjon av analytt i ekstrahert blankt blod tilsvarte 100 % ekstraksjonsutbytte; C: Analytt ble tilsatt fullblodsprøvene og ekstrahert. Internstandard ble tilsatt etter ekstraksjon i både A, B og C.

Ekstraksjonsutbytte, PE og ME ble beregnet for hvert konsentrasjonsnivå av kontroll 4 og 2. Beregningsformlene for ekstraksjonsutbytte, PE og matrikseffekt er beskrevet i **formlene 8, 9 og 10 i avsnitt 3.7.2**

3.9.7 Hematokrit-effekt

Hematokrit (HT) kunne ha påvirkning på ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt. Det var derfor essensielt å inkludere denne parameteren i metodevalideringen. I forsøket ble tre HT-nivåer testet på to ulike konsentrasjonsnivåer, kontroll 4 og kontroll 2. De ulike fullblodprøvene med forskjellige HT var laget fra en bloddonor som hadde HT-verdi på 0,48. Først ble det tappet blod fra donoren til EDTA-rør. Blodet ble separert ved å la røret stod i rommet 2-3 timer. Deretter ble plasma overført til et eppendorfrør. Blodceller ble igjen i røret. HT i røret ble målt og HT-verdien var 0,8. Blod med HT på henholdsvis 0,6, 0,4 og 0,2 ble laget ved å fortynne blodceller med plasma. Blodsammensetning i ulike HT-nivåer er beskrevet i **tabell 3.23**.

Tabell 3.23 Blodsammensetning i ulike HT-nivåer

Hematokrit nivå	0,2	0,4	0,6
Volum blodceller (HT 0,8)	100 µl	220 µl	300 µl
Volum plasma	320 µl	200 µl	150 µl
Total volum	420 µl	420 µl	450 µl

3.9.8 Spesifisitet

Elleve standardløsninger var anskaffet fra Avdeling for rettsmedisinske fag, OUS, innholdet er vist i **vedlegg 4**. Først ble det laget seks spesifisitetløsninger fra standardløsningene. Deretter ble en VAMS dyppet i hver spesifisitetløsning. Ekstraksjon ble utført med ekstraksjonsbetingelser beskrevet i **tabell 3.22**. Retensjonstid og signalintensitet for topper med like overganger som analyttene og metabolittene ble vurdert. Framgangsmåter for tillaging av løsningene i blod er oppsummert i **tabell 3.24**.

Tabell 3.24 Spesifisitetløsninger i blod

Løsning	Innhold
Spesifisitetløsning 1	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 1020B 1○ 20 µl 1020B 2○ 260 µl blod
Spesifisitetløsning 2	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 1020B 3○ 20 µl 1020B 4○ 260 µl blod
Spesifisitetløsning 3	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 1020B Std 2 1○ 20 µl 1020B Std 2 2○ 260 µl blod
Spesifisitetløsning 4	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 1007 1○ 20 µl 1007 2○ 260 µl blod
Spesifisitetløsning 5	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 1006 7○ 20 µl 1007 9○ 260 µl blod
Spesifisitetløsning 6	<ul style="list-style-type: none">○ 20 µl 610 std 5○ 180 µl blod

3.10 Analyse av reelle prøver

Tjue autentiske prøver med analyttene og deres metabolitter ble levert fra Senter for Psykofarmakologi, Diakonhjemmet Sykehus (SFP). Prøvene ble tatt fra 20 ulike pasienter i begynnelsen av januar 2020. Prøvene ble senere analysert ved Farmasøytisk institutt (FI) i slutten av januar og februar 2020. Første analyse av prøvene ble utført i slutten av januar, andre analyse av prøvene ble utført én uke etter første analyse, og siste analyse av prøvene ble utført fire uker etter første analyse. Pasientprøvene ble oppbevart i romtemperatur og beskyttet mot lys før analysene. Etter avtale med ansatte fra SFP ble fire paralleller av VAMS tatt fra samme rør ved hver blodprøvetaking før sentrifugering. Prøvene ble aidentifisert via en kodeliste av SFP og deretter ble anonymisert når kodelisten ble slettet, slik at pasientsensitiv informasjon ble beskyttet. For å unngå forventingskjevhet ble ikke innhold av prøvene oppgitt på forhånd. Innhold og tilhørende konsentrasjoner i VAMS-prøvene er oppsummert i **avsnitt 4.4**. Ekstraksjonsbetingelser er oppgitt i **tabell 3.22**

4 Resultater og diskusjon

4.1 Innledende forsøk

Ekstraksjonsbetingelser som ble brukt i innledende forsøk var basert på tidligere arbeid med PALME ekstraksjon av ulike antidepressiva og antipsykotika i plasma [38, 45, 54]. Det ble tatt utgangspunkt i to tidligere forsøk der henholdsvis NaOH [38] og karbonat-bikarbonatbuffer [54] ble benyttet som donorløsning. I begge forsøkene ble TOA i DDA benyttet som organisk væskemembran, og maursyre ble brukt som akseptorløsning. I den ene forsøket ble 43 basiske analytter ekstrahert fra plasma [54], mens i det andre ble et utvalgt av psykofarmaka ekstrahert fra plasma [38]. Disse betingelsene ble reprodusert med vandige prøveløsninger og fullblodprøver for å finne optimale betingelser for fullblod og bruke disse for å lage en VAMS-metode. O-desmetylvenlafaksin, venlafaksin, kvetiapin, amitriptylin og nortriptylin, klorprotiksen som var undersøkt i de tidligere forsøkene ble derfor inkludert i oppgaven. Aripiprazol var ikke blitt undersøkt før, men da dette er et vanlig antipsykotikum var det ønskelig å inkludere analytten i oppgaven.

4.1.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra vandige prøveløsninger

Et utvalg av psykofarmaka og deres metabolitter, amitriptylin, nortriptylin, venlafaksin, kvetiapin, O-desmetylvenlafaksin, fluoksetin og norfluoksetin ble benyttet i forsøket. På grunn av dårlig respons i LC-MS/MS metoden ble fluoksetin og norfluoksetin ikke inkludert i videre forsøk. Resultater for fluoksetin og norfluoksetin er derfor ikke tatt med oppgaven. PALME ble vurdert med hensyn på prosesseffektivitet (PE) og presisjon (RSD). PE og RSD for ulike ekstraksjonskombinasjoner er vist i **Figur 13**.

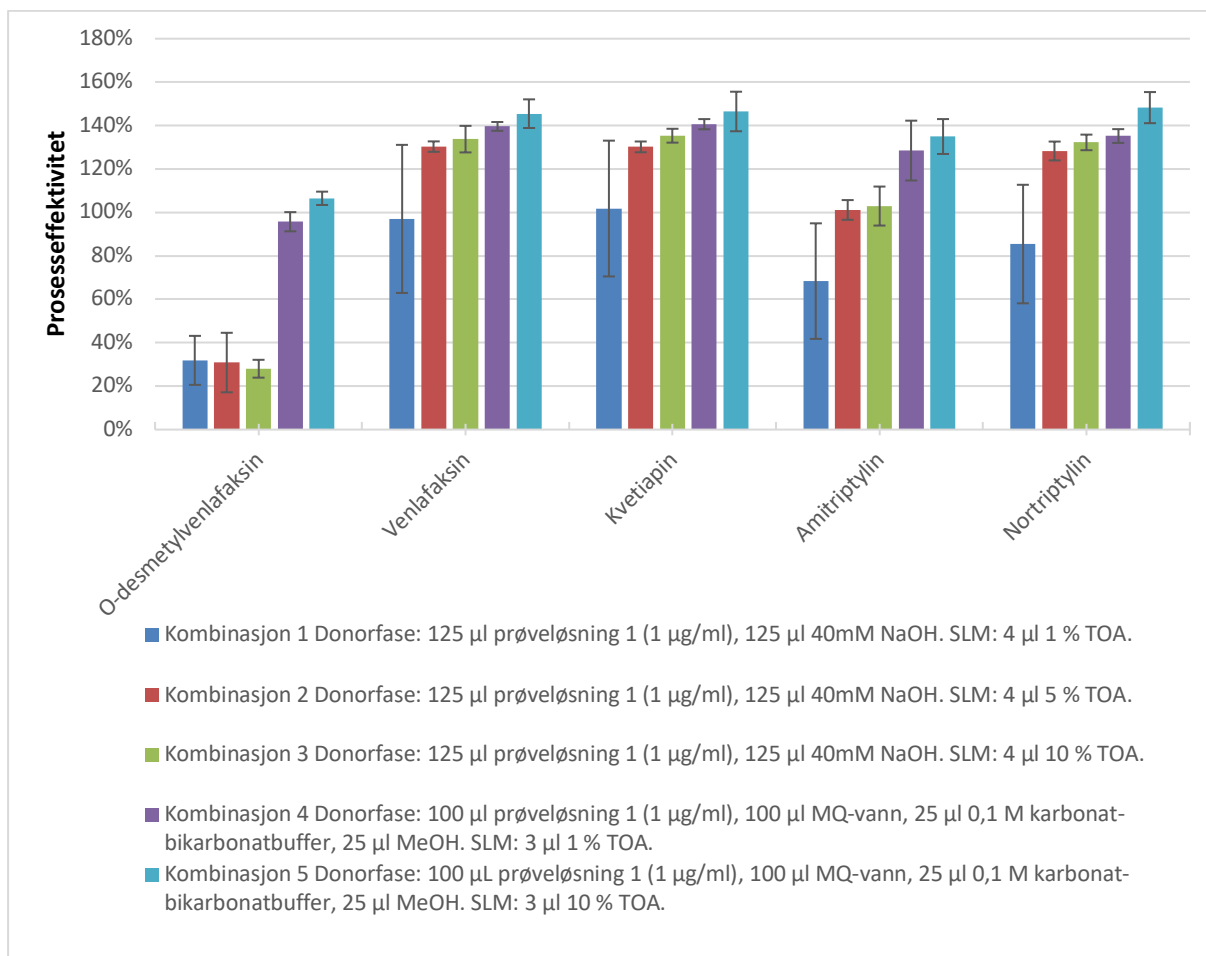
Kombinasjonene 4 og 5 ga bedre prosesseffektivitet i forhold til de andre kombinasjonene. Dette kan skyldes bruk av ulike donorløsninger i betingelsene. Donorløsningene har en basisk pH som undertrykker ionisering av analyttene slik at de forblir i nøytral form. 40 mM NaOH med pH 12 ble brukt i kombinasjonene 1- 3, mens 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer med pH 10 ble benyttet i kombinasjonene 4 og 5. Dette var pH til donorløsningen før tilsats til donorbrønner. Reell pH i prøvene ble ikke målt. Ved sammenskriving av oppgave ble det innsett at dette burde blitt gjort, men pH ble ikke målt siden det ikke var tilgang til laben på

grunn av situasjonen rundt korona-viruset. MeOH ble tilsatt donorbrønn i kombinasjonene 4 og 5 for å hindre adsorpsjon av analyttene til veggen til donorplaten og dermed sikre en mer effektiv transport av analytt fra donorfase og inn i SLM [44].

Forskjellen mellom kombinasjonene 4 og 5 var innholdet i SLM. Det ble brukt 1 % TOA i kombinasjonen 4 og 10% TOA i kombinasjonen 5. Innholdet i SLM var også forskjellig i kombinasjonene 1, 2 og 3. TOA var tilsatt i DDA som er organisk væskemembran for å maskere uspesifikke bindinger mellom analyttene og PVDF-membranen [40, 45]. Tidligere forsøk har vist at økt konsentrasjon av TOA i organisk væskemembran ga bedre prosesseffektivitet, hvor antall analytter med utbytte over 40 % økte fra 28 % til 38 %. Dette kan forklare hvorfor kombinasjonen 5 ga bedre prosesseffektivitet enn kombinasjonen 4 [54].

PE for analyttene lå i området 28-146 % og RSD lå i området 2-14 %. Variasjon i prosesseffektivitet kan skyldes uspesifikke bindinger mellom analyttene og PVDF-membranen ved bruk av dodecylacetat som organisk væskemembran og adsorpsjon til polypropylen-materialet i donorbrønnene [44]. Matrikseffekt kan være en forklare på PE over 100 %, hvor interferenser i medium kunne forsterke signalintensiteten til analyttene og PE ble dermed høy.

Ved tidligere forsøk fant man PE ved bruk av NaOH og karbonat-bikarbonatbuffer som donorløsning henholdsvis i området 45-85% [38] og 52-91% [54]. PE ved bruk av NaOH som donorløsning er lavere enn PE ved bruk av karbonat-buffer som donorløsning både i oppgaven og i tidligere forsøk. Variasjon mellom resultatene i oppgaven og resultatene fra tidligere forsøk kan skyldes ulike prøvemedium, hvor plasma ble brukt i tidligere forsøk og MQ-vann ble brukt i oppgaven som prøvemedium.



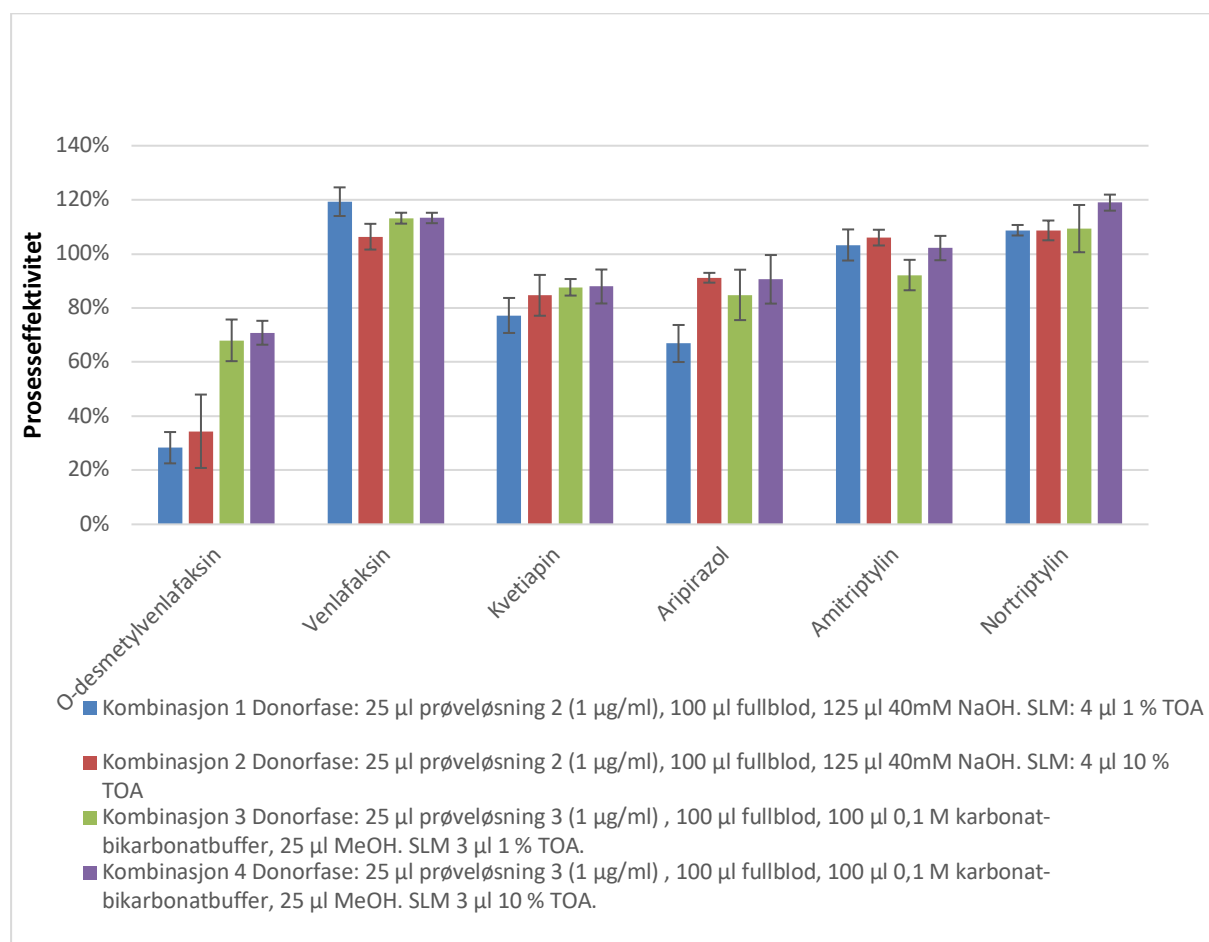
Figur 13: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet og presisjon for ulike ekstraksjonskombinasjoner med PALME fra vandige prøveløsninger. Ekstraksjonsbetingelser for donorfase og SLM i kombinasjonene er oppgitt i figuren. 50 µl 20 mM maursyre ble benyttet som akseptorfase i alle kombinasjonene. Ekstraksjonstid: 60 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=5)

4.1.2 Optimalisering av ekstraksjonsparametere fra prøveløsninger med fullblod

Donorfase og organisk væskemembran

To ulike donorløsninger med henholdsvis 40 mM NaOH og 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer ble testet. Donorløsningene ble samtidig testet ut med to ulike volum av SLM og ulike konsentrasjoner av TOA i DDA (**tabell 3.18 i avsnitt 3.7.2**). For å se hvilken donorfase-væskemembran-kombinasjon som egnet seg best for analyttene ved PALME-ekstraksjon ble både PE og RSD vurdert i forsøket. **Figur 14** viser PE og RSD til analyttene i ulike kombinasjoner av donorløsning og organisk væskemembran. Prosesseffektivitet lå i området 28-119%, mens RSD lå i området 2-14 %.

Resultatet presentert i **figur 14** viser samme trend som for de vandige prøvene at i forhold til NaOH forbedret karbonat-bikarbonatbuffer prosesseffektivitet for de fleste stoffene, spesielt O-desmetylvenlafaksin. To ulike volumer av SLM ble brukt i forsøkene. Volumene var 3 og 4 μl som var innenfor anbefalt volumsområde. Basert på tidligere forsøk vil ikke forskjellen i volumene påvirke prosesseffektivitet i særlig grad [44]. Derimot kan konsentrasjon av TOA påvirke PE. Et tidligere forsøk har vist at høyere konsentrasjon av TOA ga bedre prosesseffektivitet [54]. Bedre prosesseffektivitet kan forklares at ved høyere konsentrasjon var TOA mer tilgjengelig til å maskere bindings seter i filtermembranen slik at flere av analyttene diffunderte igjennom membranen. Det ble også observert at kombinasjonen med 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer, MeOH i donorfase og 3 μl 10 % TOA som SLM ga best prosesseffektivitet med lav RSD i begge forsøkene. Denne kombinasjonen ble derfor brukt videre i optimaliseringsforsøkene i fullblod og i VAMS.



Figur 14: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet og presisjon for ulike ekstraksjonskombinasjoner med PALME i fullblodsprøveløsninger. Ekstraksjonsbetingelser for donorfase og SLM i kombinasjonene er oppgitt i figuren. 50 μl 20 mM maursyre ble benyttet som akseptorfase i alle kombinasjonene. Ekstraksjonstid: 60 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=5)

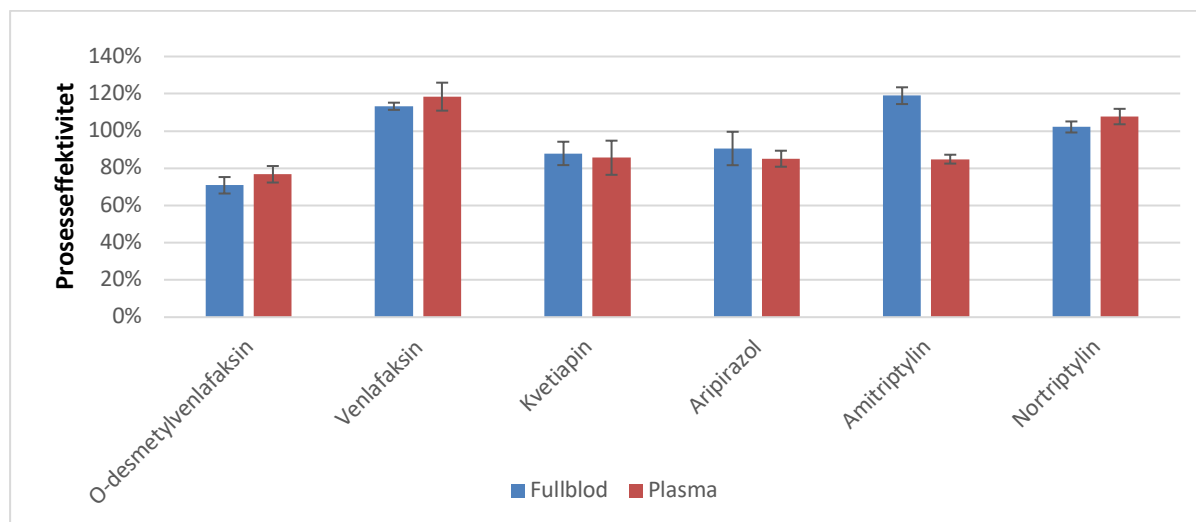
PALME i fullblod og plasma og sammenligning mellom ulike prøveløsninger

Ettersom de innledende forsøkene var basert på tidligere forsøk, hvor plasma var prøvematriks [38, 54] var det interessant å sammenligne PALME av analyttene i både fullblod og plasma. Fire analytter og to metabolitter ble benyttet i forsøket hvor de ble ekstrahert fra enten fullblod eller plasma. PE og RSD til stoffene for hver prøveløsning ble beregnet for å sammenligne ekstraksjon mellom ulike biologiske matrikser. Legemiddelkonsentrasjoner i fullblod og plasma kan være forskjellige på grunn av fordeling av analyttene i de ulike blodkomponentene [30]. **Figur 15** viser derimot at det ikke ble signifikant forskjell mellom blod og plasma, mens RSD var lav og lå i området 2-13 %. PE til noen stoffer er høyere enn 100 %. Matrikseffekt kan være en årsak for den høye PE-verdien. Det ble funnet tilsvarende verdier for prosesseffektivitet ved ekstraksjon fra plasma i de tidligere forsøkene. Ved tidligere forsøk var PE ved bruk av NaOH og karbonat-bikarbonatbuffer som donorløsning henholdsvis i området 45-85% [38] og 52-91% [54]. Forsøket med karbonat-bikarbonatbuffer som donorløsning [54], betingelsen som brukes for optimalisering VAMS-metoden, har litt lavere PE-verdier men samme størrelsesorden og innbyrdes variasjon sammenlignet med resultater for ekstraksjon fra plasma i oppgaven (**tabell 4.1**).

Tabell 4.1 Sammenligning av PE ved ekstraksjon fra plasma

Analytt	PE ved tidligere forsøk [54]	PE i oppgaven
Amitriptylin	60 %	85 %
Kvetiapin	61 %	86 %
Nortriptylin	77 %	108%
Venlafaksin	91 %	118 %

Prosesseffektivitet fra vandig prøveløsning var høyere enn prosesseffektivitet fra fullblod og plasma ved sammenligning av ekstraksjon fra vandige, fullblod og plasma prøveløsninger i karbonat-bikarbonatbuffer (**Figur 13, figur 14, figur 15**). Årsaker kan være proteinbinding i donorløsningen fra plasma og fullblod og matrikseffekt i LC-MS/MS [18].



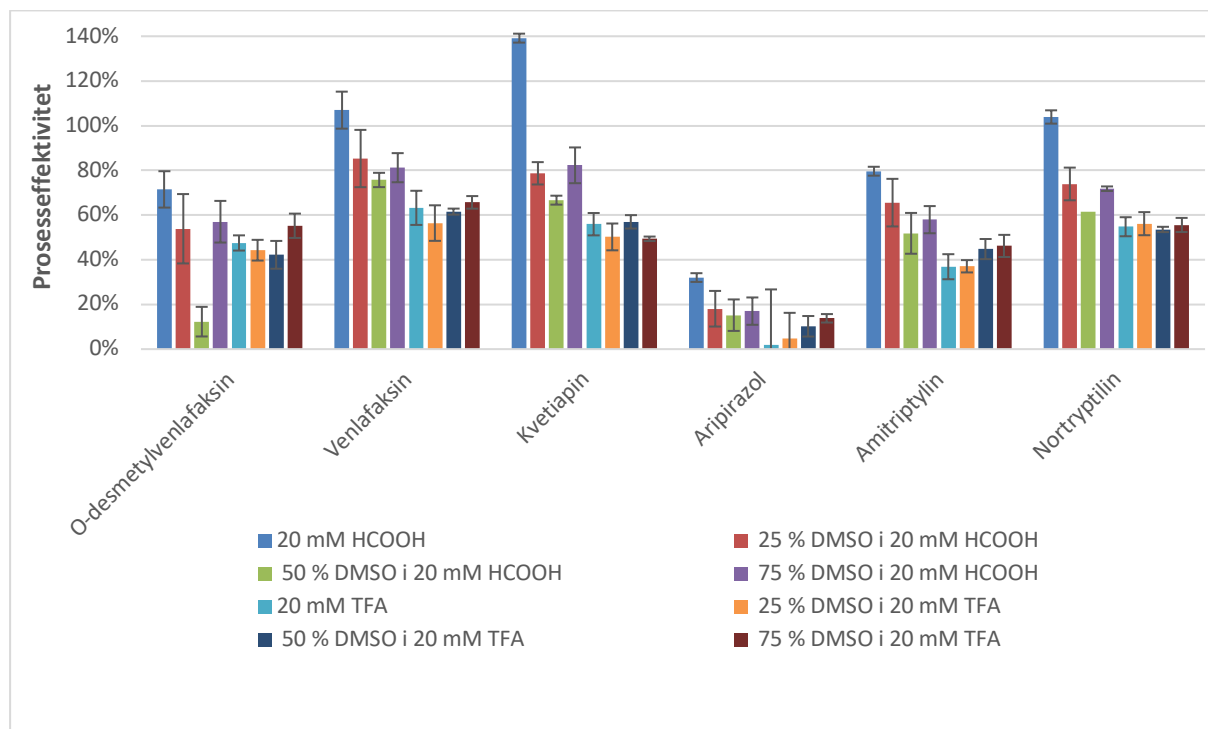
Figur 15: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet og presisjon for ekstraksjon med prøveløsning i fullblod og plasma. Ekstraksjonsbetingelser for donorfase: 25 μ l prøveløsning 3 (1 μ g/ml), 100 μ l fullblod/plasma, 100 μ l 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer, 25 μ l MeOH og SLM: 3 μ l 10 % TOA. 50 μ l 20 mM maursyre ble benyttet som akseptorfase i alle kombinasjonene. Ekstraksjonstid: 60 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

Akseptorløsning

Transport av analytter fra prøveløsning i donorfase til organisk væskemembran og transport av analytter fra organisk væskemembran til akseptorløsning er to avgjørende trinn i ekstraksjonsprosessen ved PALME. Det er derfor viktig å optimalisere løseligheten i akseptorløsning for økning av prosesseffektiviteten. Endringer i akseptorløsningen, som for eksempel endring av pH-verdien ved bruk av ulike akseptorløsninger og endring av kjemiske sammensetning i akseptorløsningene, ble testet for dette formålet. Maursyre og trifluoreddiksyre alene eller i kombinasjon med DMSO ble testet som akseptor (**tabell 3.20**). I forsøket ble PE for legemidlene i åtte ulike akseptorløsninger sammenlignet. For å beregne PE ble det laget åtte forskjellige eksternstandarder i rene akseptorløsningene med konsentrasjoner som tilsvarte 100 % PE. Volum av fullblod i forsøket var 20 μ l og var lavere enn tidligere forsøk siden det var ønskelig å ha samme volum som VAMS kan absorbere.

Det er viktig at akseptorløsningen er kompatibel med LC-MS/MS for å kunne injiseres direkte i instrumentet [18]. 20 mM trifluoreddiksyre og 20 mM maursyre har pH-verdier på henholdsvis 1 og 2-2,5 som sikret at analyttene ble fullstendig protonert, noe som fremmer ekstraksjon fra væskemembran til akseptorfase. DMSO er et organisk løsemiddel, og akseptorløsningen vil bli mindre polar ved tilsetning av DMSO. For hydrofobe analytter er det derfor forventet økt prosesseffektivitet på grunn av økt løselighet av analyttene [42]. Resultatet presentert i **Figur 16** viser derimot at ren 20 mM maursyre ga høyest prosesseffektivitet ved

sammenligning med maursyre tilsatt DMSO og med 20 mM TFA. Det ble derfor bestemt å videre benytte 20 mM maursyre som akseptorløsning. En annen årsak for valget var at det er mer erfaring med 20 mM maursyre som akseptorløsning ved tidligere forsøk[18, 38, 40, 54].



Figur 16: Gjennomsnittlig prosesseffektivitet ved endringer i akseptorløsning. Ekstraksjonsbetingelser for donorfase: 25 μ l prøveløsning 4 (5 μ g/ml), 20 μ l fullblod, 185 μ l 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer, 25 μ l MeOH og SLM: 3 μ l 10 % TOA. Akseptorfase: 50 μ l donorløsning . Ekstraksjonstid: 60 minutter. Ristehastighet: 900 rpm. (n=4)

Linearitet

I testen ble flere stoffer benyttet, formålet var å inkludere flere psykofarmaka som var relevante for TDM i oppgaven. For å undersøke analyttenes linearitet (r^2) ved ekstraksjon fra fullblod som prøveløsning ble kalibreringskurver basert på åtte konsentrasjoner i området 10-2000 ng/ml laget for hver analytt. **Tabell 4.2** presenterer linearitet til analyttene både med og uten internstandardkorrigering. Prosesseffektivitet for analyttene i ulike konsentrasjoner ved ekstraksjon fra fullblod vises i **tabell 4.3**

Tabell 4.2 Linearitet ved PALME fra fullblod med ($r^2 + IS$) og uten ($r^2 - IS$) internstandardkorrigering

Analytt	r^2 med IS	r^2 uten IS
O -desmetylvenlafaksin	0,999	0,995
Venlafaksin	0,999	0,994
Escitalopram	0,995	0,993
Kvetapin	0,993	0,988
Aripiprazol	0,989	0,980
Amitriptylin	0,993	0,985
Nortriptylin	0,994	0,989
Klorprotiksen	0,999	0,995

Donorfase: 20 μ l kalibrator (10-2000 ng/ml), 20 μ l fullblod, 20 μ l IS-løsning 1, 165 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer, 25 μ l MeOH. SLM: 3 μ l 10% TOA. Akseptorfase: 50 μ l 20 mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet 900 rpm (n=4)

Ved kvantitativ analyse av analytter bør kalibreringskurvene være lineære med en korrelasjonskoeffisient (r^2) på $\geq 0,99$. En korrelasjonskoeffisient som er tilnærmet 1 tyder på en sterk sammenheng mellom analyttsignalet og analyttkonsentrasjonen [58]. **Tabell 4.2** viser at lineariteten uten IS-korrigering ved ekstraksjon av kalibratorer i fullblod stort sett er tilfredsstillende ($r^2 \geq 0,99$), med noen unntak. Årsaken til $r^2 < 0,99$ for analyttene kan være uspesifikk binding av analytten til PVDF-membranen [44].

Ved bruk av internstandard ble internstandarder for den enkelte analytt tilsatt med samme kjente konsentrasjon i alle prøver før ekstraksjon. Responsen beregnes som toppareal eller topphøyde delt på tilsvarende areal eller høyde for internstandard. Internstandardene oppførte seg som de tilhørende analyttene under ekstraksjonen. Dermed vil internstandardene korrigere for tilfeldige endringer som skjer under ekstraksjonen og korrigere for variabelt injeksjonsvolum i LC-MS/MS [58, 59]. **Tabellen 4.2** viser at kalibreringskurvene har bedre linearitet med IS-korrigering, hvor korrelasjonskoeffisient var over 0,99, bortsett fra aripiprazol.

Tabell 4.3 Prosesseffektivitet (RSD) til analyttene i ulike konsentrasjonsnivåer i blod

Konsentrasjon (ng/ml)	O-desmetyl venlafaksin	Venlafaksin	Escitalopram	Kvetiapin
10	51 % (8%)	94 % (3 %)	43 % (5%)	278 % (2%)
25	52 % (9%)	110 % (7 %)	69 % (2%)	253 % (4%)
50	64 % (15%)	138 % (12 %)	82 % (10 %)	801 % (12%)
100	64 % (14%)	119 % (10 %)	80 % (11 %)	216 % (12%)
250	57 % (4%)	108 % (1 %)	73 % (1%)	147 % (2%)
500	55 % (3%)	102 % (1 %)	69 % (2%)	122 % (2%)
1000	61 % (2%)	108 % (2 %)	80 % (3%)	136 % (0,5%)
2000	67 % (4%)	110 % (4 %)	84 % (4%)	97 % (6%)
Konsentrasjon (ng/ml)	Aripiprazol	Amitriptylin	Nortriptylin	Klorproktisen
10	18 % (6%)	49 % (14%)	126 % (9%)	51 % (8%)
25	52 % (15%)	74 % (3%)	104 % (11%)	52 % (9%)
50	121 % (5%)	98 % (8%)	100 % (4%)	64 % (15%)
100	78 % (9%)	83 % (7%)	89 % (6%)	64 % (14%)
250	85 % (3%)	80 % (2%)	81 % (3%)	57 % (4%)
500	70 % (5%)	82 % (6%)	83 % (2%)	55 % (3%)
1000	78 % (1%)	81 % (4%)	87 % (3%)	61 % (2%)
2000	95 % (12%)	83 % (11%)	90 % (5%)	67 % (4%)

Donorfase: 20 µl kalibrator (10-2000 ng/ml), 20 µl fullblod, 20 µl IS-løsning 1, 165 µl 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer, 25 µl MeOH. SLM: 3 µl 10% TOA. Akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet: 900 rpm (n=4)

Prosesseffektivitet mellom ulike konsentrasjonsnivåer for enkelte stoff varierer i noen grad fra hverandre, hvor særlig PE ved laveste konsentrasjonsnivå skiller seg ut fra andre konsentrasjonsnivåer (**tabell 4.3**). Dette skjer spesielt med aripiprazol, amitriptylin og escitalopram. Avviket mellom det laveste konsentrasjonsnivået og andre konsentrasjonsnivåer kan tyder på at binding mellom analytt og PVDF-membranen var til stede. Hvis det laveste konsentrasjonsnivået er tatt bort fra standardrekken blir variasjonen mindre og prosesseffektivitet til stoffene fra fullblod er konsentrasjonsuavhengig i området 25-2000 ng/ml. PE til kvetiapin varierte fra 97% til 801 %. Det var vanskelig å forklare hvorfor PE til

kvetiapin ved konsentrasjonsnivå 50 var 801 %. På bakgrunn av dette ble derfor utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt undersøkt i et nytt forsøk.

Utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt

Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt til analyttene i fullblod ble undersøkt ved lavt (50 ng/ml) og høyt (500 ng/ml) konsentrasjonsnivå. Forsøksoppsettet basert på Matuszewskis metode [55] ble beskrevet i **avsnitt 3.7.2 (Bestemmelse av utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt)**. Resultater til forsøket er oppsummert i **tabell 4.4**. Siden RSD er lavere uten internstandardkorrigering ble resultater uten IS-korrigering brukt for diskusjon. Resultater for utbytte, PE og ME med IS-korrigering er vist i **vedlegg 2**.

Tabell 4.4 Utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt for analytter i 50 og 500 ng/ml prøveløsning uten IS korrigering

Analytt	50 ng/ml			500 ng/ml		
	Utbytte (RSD)	PE (RSD)	ME (RSD)	Utbytte (RSD)	PE (RSD)	ME (RSD)
O-desmetylvenlafaksin	43% (20%)	59% (12%)	153% (21%)	72% (6%)	72% (17%)	100% (13%)
Venlafaksin	85% (30%)	118% (5%)	149% (32%)	104% (4%)	111% (12%)	107% (8%)
Escitalopram	82% (15%)	104% (9%)	134% (17%)	97% (5%)	96% (18%)	98% (14%)
Kvetiapin	100% (2%)	617% (4%)	625% (5%)	106% (5%)	142% (12%)	133% (12%)
Aripiprazol	101% (8%)	98% (10%)	99% (8%)	95% (3%)	74% (1%)	78% (2%)
Amitriptylin	68% (24%)	87% (7%)	138% (28%)	88% (19%)	103% (11%)	88% (19%)
Notriptylin	74% (26%)	104% (2%)	148% (33%)	102% (16%)	102% (13%)	102% (16%)
Klorprotiksen	73% (15%)	73% (15%)	107% (6%)	79% (13%)	73% (18%)	92% (9%)

Det er ønskelige at ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet skal være så nær 100 % som mulig. Prosesseffektivitet defineres som kvalitet av hele den analytisk prosess inkludert prøveopparbeidelse og analyse, mens utbytte defineres som effektivitet til prøveopparbeidelsen [55, 60]. Resultatene viser at de fleste analytter har høyt ekstraksjonsutbytte og PE. Ekstraksjonsutbytte lå i området 43-106% mens PE til analyttene unntak kvetiapin lå i området 59-118 %. Både ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet varierer mellom stoffene, men er relativt konstante mellom konsentrasjonsnivåer, med noen unntak. PE til kvetiapin var høyt i begge konsentrasjoner, spesielt ved lav konsentrasjon. Ved forrige test var PE til kvetiapin også høye ved disse konsentrasjonsnivåene. Det er vanskelig å forklare årsaken til høy PE for kvetiapin, men tendens til høye PE i begge forsøkene kan muligens forklares ved at det ble brukt samme standarder (50 ng/ml og 500 ng/ml) i begge forsøkene og at standardene kan ha vært feil tillaget. RSD til ekstraksjonsutbyttet og prosesseffektiviteten lå henholdsvis i områdene 2-30% og 2-15% ved lav konsentrasjon, 3-19% og 1-18% ved høy konsentrasjon. Det kan konkluderes at PALME i fullblod ga høyt ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet med akseptable RSD-verdier.

Fullblodprøver inneholder proteiner, lipider, sukker, salt og andre endogene forbindelser som kan ko-eluere med analytter og påvirke ioniseringsprosessen i LC-MS/MS [60]. Dette defineres som matrikseffekter (ME), og er ofte en utfordring ved analyse med LC-MS/MS. Interferensene kan undertrykke eller forsterke signalintensiteten til analyttionene, og påvirker dermed reproduserbarheten og nøyaktighet til metoden [55]. Matrikseffekten kan bestemmes ved å benytte enten Matuszewskis metode eller post-kolonnieinfusjon [60]. I denne oppgaven ble den førstnevnte metoden benyttet. Matrikseffekt lå i området 99-625% ved lav konsentrasjon og 78-132% ved høy konsentrasjonen. Kravet for ME er mellom 80% og 120%. Dermed ble ME ved høy konsentrasjonen ansett som akseptable. Det kan være at ikke alle interferenser fra fullblod ble eliminert med ekstraksjonsmetoden, og at dette har større innvirkning på det lave nivået. PE og ME til kvetiapin ved lav konsentrasjonsnivå var høy i forhold til høy konsentrasjonsnivå. Dette var vanskelig å forklare.

Siden hensikten med oppgaven var å optimalisere og utvikle PALME med VAMS som prøvetaking ble ikke det gjort flere forsøk for å forbedre PE og utbyttet og redusere ME, men arbeidet videre med optimalisering av PALME ekstraksjon med VAMS og metodevalidering. Resultatene fra de innledende forsøkene ble benyttet som en referanse for å sammenligne PALME fra fullblod og VAMS.

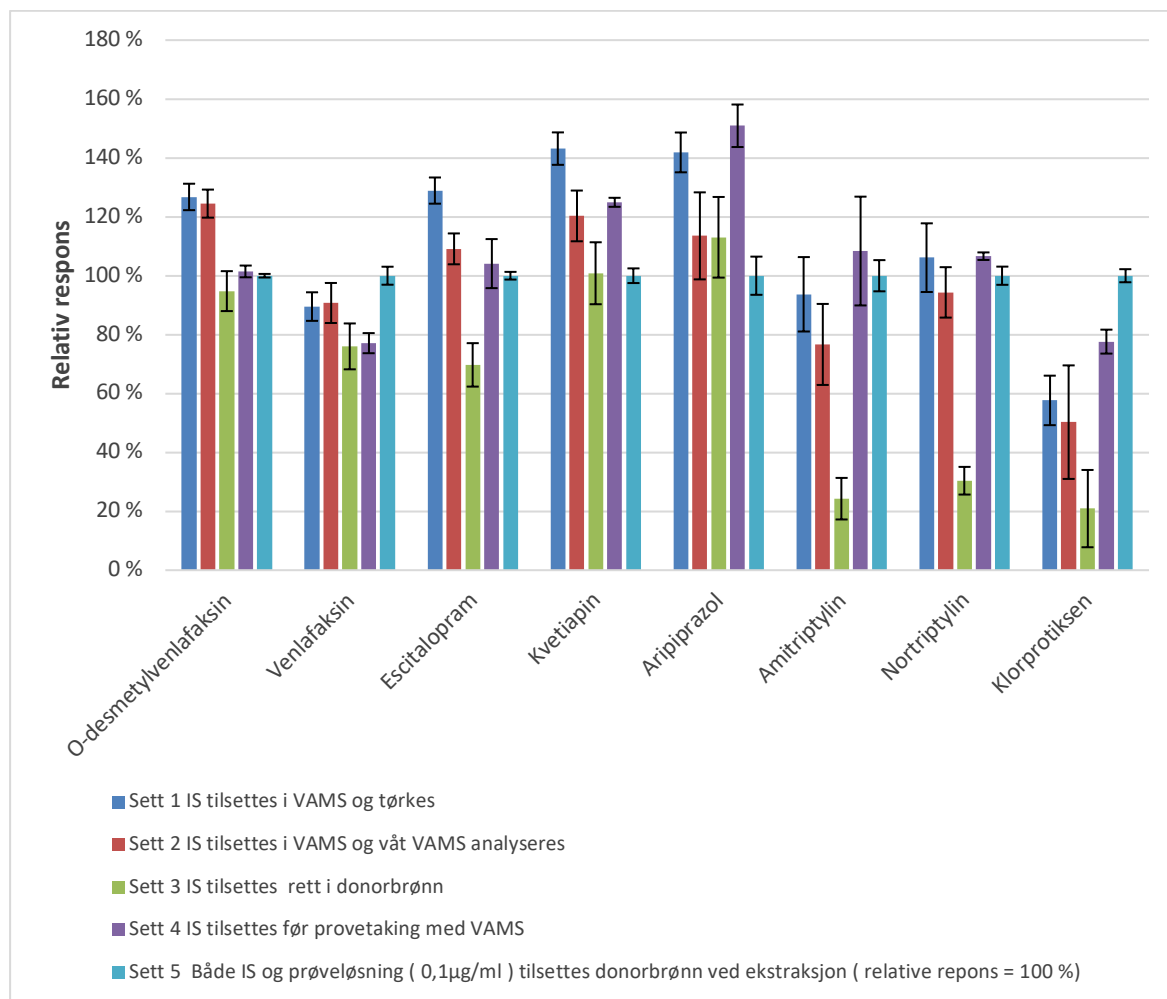
4.2 Optimalisering av PALME-ekstraksjon fra VAMS

Inkorporering av internstandard før prøveopparbeidelsen

I følge retningslinjer for utvikling og validering av DBS-baserte metoder er det essensielt å vurdere måten å inkorporere internstandard ved prøveopparbeidelsen [57]. Testen ble utført for å undersøke om internstandard kunne kompensere for tilfeldig endring under ekstraksjon og analyse. Internstandard er stoff som er relativt lik analytten både i kjemisk struktur og i fysikalsk-kjemisk egenskaper. Isotopmerket internstandard er en internstandard som har kjemisk struktur og fysikalsk-kjemiske egenskaper som likner mest på analytten og er førstevalg som internstandard [61]. Deuteriumisotopmerket internstandard til hver analytt tilsettes prøveløsning i kjent konsentrasjon før prøveopparbeidelsen. For aripiprazol og klorprotiksen ble henholdsvis kvetiapin d8 og amitriptylin d3 brukt som internstandard. Under prøveopparbeidelsen og analysen vil IS oppføre seg likt som analytten og vil dermed korrigere eventuelle endringer som skjer under prøveopparbeidelsen og analysen. I forsøket ble IS tilsatt på fire ulike måter: 1) IS tilsatt til tippet av VAMS etter prøvetaking og tørket VAMS analyseres, 2) IS tilsatt til tippet av VAMS etter prøvetaking og våt VAMS analyseres, 3) IS tilsatt direkte i donorbrønn og 4) IS tilsatt til tippet før prøvetaking.

For sammenligning ble ett sett (sett 5) der både IS og prøveløsning og VAMS med 0-blod (blod uten tilsatt analytt) ble tilsatt til donorbrønnen brukt som en referanse, hvor forhold mellom signalintensitet av analytt og internstandard tilsvarte 100 % frigjøring av analytt og internstandard fra VAMS til donorfase. Resultater er vist i **figur 17**.

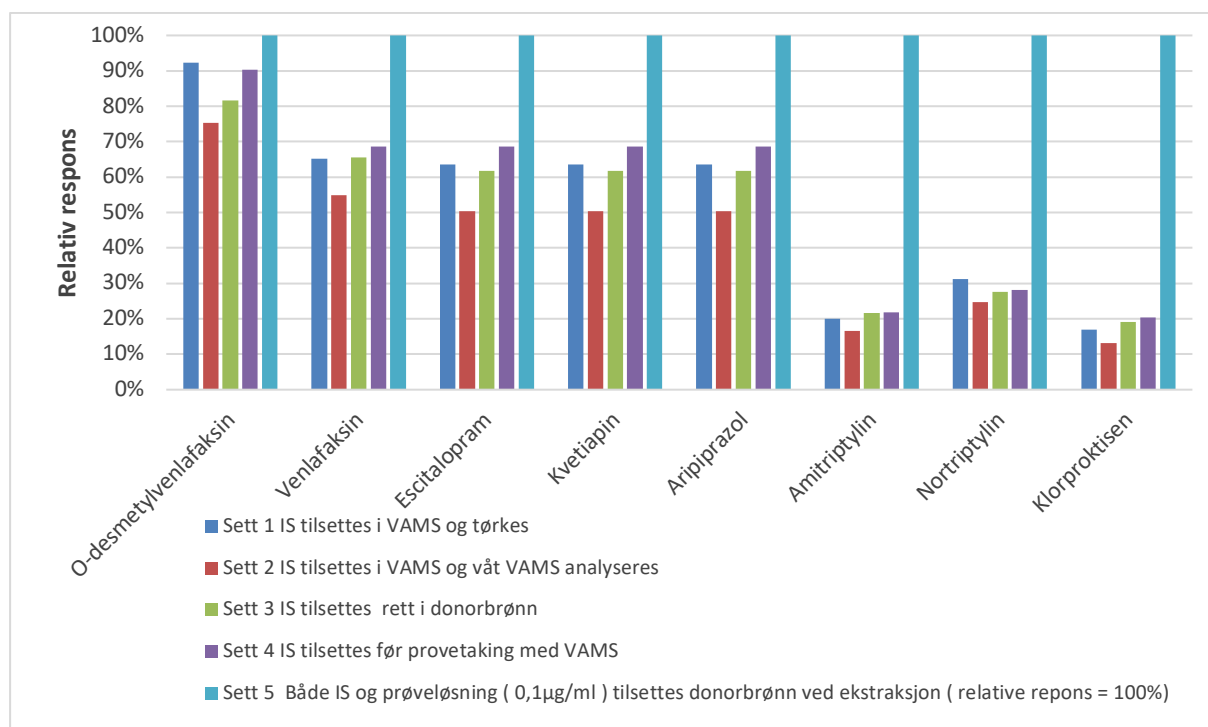
Resultater i **figur 17** viser at relativ respons når IS ble tilsatt før prøvetaking (sett 4) er mest tilnærmet referansen (sett 5) for de fleste stoffene. Til tross for dette ble ikke denne metode valg for inkorporering av internstandard. Grunnen var at det er vanskelig å praktisere metoden i transport, oppbevaring og analyse, for reelle pasientprøver vil en ikke kunne garantere sterile VAMS hvis laboratoriet selv tilsetter internstandard på forhånd. I tillegg er det nesten umulig å benytte samme batch av IS-løsning for kalibrering, kontroller og reelle pasientprøver i stor skala [57].



Figur 17: Sammenligning av ulike måte å inkorporere internstandard før ekstraksjon (relative respons korrigert med IS). Ekstraksjonsbetingelser: Donorfase: VAMS, IS (sett 3 og 5), prøveløsning (sett 5), 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer, 25 μ l MeOH. SLM: 3 μ l 10% TOA. Akseptorfase: 50 μ l 20 mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet 900 rpm ($n=3$).

Å tilsette internstandard rett i brønnen (sett 3) ville være den mest praktiske måten for analyselaboratoriet. For enkelte stoffer, amitriptylin, nortriptylin og kloprotiksen, som er mer hydrofobe, ble relativ respons veldig lav for sett 3, **figur 17 og figur 18** viser at disse stoffene ble sittende igjen i VAMSene. Når IS ikke ble en del av VAMS-prøve da de ikke ble innlemmet i prøvemedium (fullblod) med analyttene og metabolittene før ekstraksjon, førte dette til at IS ikke ble ekstrahert på lik linje med analyttene [62]. En mulig forklaring er at disse stoffene har høy proteinbindingsgrad, og frigjøring av stoffene fra VAMS til donorfase ble dermed lav. Derimot var ikke tilhørende IS til stoffene innlemmet i matriksen og ble derfor ekstrahert i stor grad til akseptorfase. Dette førte til lav arealforhold (A_s/A_i) mellom stoff (A_s) og internstandard (A_i). Aripiprazol skiller seg ut hvor relativ respons for sett 3 var høyere enn relativ respons for sett 5 (relativ respons = 100%), selv om aripiprazol har både høy proteinbindingsgrad og høy log P.

Det var ikke stor variasjon mellom relativ respons når VAMS med IS tørkes før analyse (sett 1) og når VAMS analyseres umiddelbar etter tilsatt av IS (sett 2). Dette kan forklare ved at IS ble inkorporert i VAMS og ble ekstrahert på lik linje med analyttene. Ved metoden der VAMS med IS tørkes før analysere (sett 1) blir IS integrert i VAMS-prøvene og tørket på sammen måte som for analytt. IS og analyttene ble ekstrahert på lik linje ved PALME. IS kan korrigere for tilfeldige endringer under ekstraksjon og analyse. **Figur 18** viser at noe mer av analytten frigjøres fra VAMSen med denne måten enn med sett 2, noe som vil kunne gi bedre deteksjonsgrenser. Denne metoden ble dermed valgt for optimalisering av inkorporering av internstandard til tross for at det var variasjon i relativrespons for stoffene, og relativrespons ikke var tilnærmet 100 %.

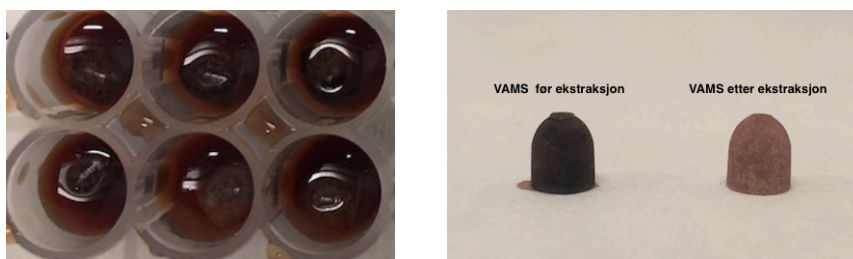


Figur 18: Relativ respons til analytter hvor IS ble inkorporert på forskjellige måte, uten korrigerings IS og RSD. Ekstraksjonsbetingelser: Donorfase: VAMS, IS (sett 3 og 5), prøveløsning (sett 5), 0,1M karbonatbikarbonatbuffer, 25 µl MeOH. SLM: 3 µl 10% TOA. Akseptorfase: 50 µl 20 mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet 900 rpm (n=3).

Donorfase

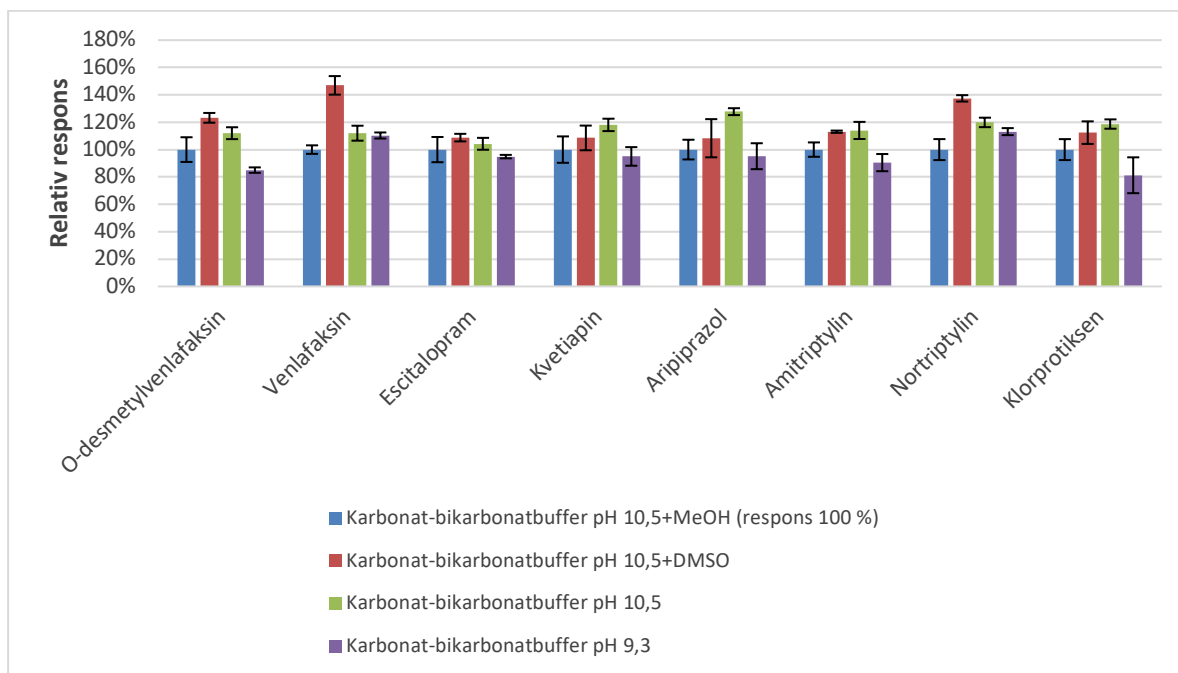
Tippen var opprinnelig hvit og ble rød etter tilsats av fullblod. Hvis all blodmatriks ble frigjort fra VAMSen skulle den bli hvit etter ekstraksjonen. I en tidligere masteroppgave med PALME-ekstraksjon av rusmidler fra blod VAMS hvit etter ekstraksjon [42]. Siden det så ut til å sitte igjen blod i polymermaterialet etter ekstraksjonen i forsøkene med psykofarmaka ble en videre optimalisering av donorfasen forsøkt for å få all blodmatriks og dermed stoffene ut av VAMS. Fire betingelser for donorfase ble testet i forsøket:

- Betingelse 1: 0,1M 200 μ l karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l MeOH
- Betingelse 2: 0,1M 200 μ l karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l DMSO
- Betingelse 3: 0,1M 225 μ l karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5
- Betingelse 4: 0,1M 225 μ l karbonat-bikarbonatbuffer pH 9,3

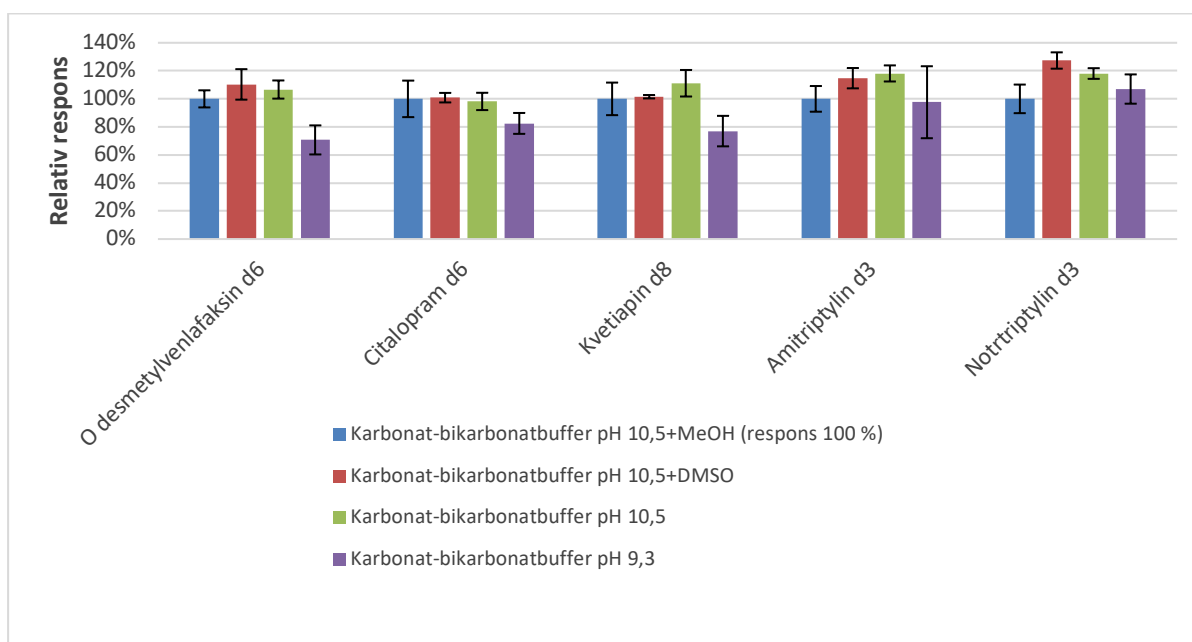


Figur 19: Bilder av VAMS etter ekstraksjon. Venstre: VAMS i donorbrønner etter ekstraksjon. Høyre: sammenligning mellom VAMS før ekstraksjon og VAMS etter ekstraksjon.

Betingelse 1 med karbonat-bikarbonatbuffer pH 10 og MeOH, som var betingelsen som ga best prosesseffektivitet i de innledende forsøkene med vandige prøveløsninger og fullblod tilsatt analytter, ble brukt som referanserrespons i forsøket (respons 100 %). Betingelse 4 svarte til tidligere ekstraksjon av rusmidler [42]. Hensikten med forsøket var å studere hvordan analytt og internstandard ble ekstrahert fra forskjellige donorfaser. Arealforhold til stoffene mellom betingelse 1 og hver av betingelsene ble beregnet og sammenlignet. Resultater er vist i **figur 20** og **figur 21**.



Figur 20: Sammenligning relative respons til analyttene og metabolitten i ulike donorfase uten korrigeret med IS. Ekstraksjonsbetingelser til donorfase: VAMS med prøveløsning og IS-løsning 1, 200 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l MeOH /200 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l DMSO/225 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5/225 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 9,3. SLM 10% 3 μ l TOA. Akseptorfase: 50 μ l 20mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet 900 rpm (n=3).



Figur 21: Sammenligning relative respons til internstandard i ulike donorfase. Ekstraksjonsbetingelser til donorfase: VAMS med prøveløsning og IS-løsning 1, 200 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l MeOH /200 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 μ l DMSO/225 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5/225 μ l 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 9,3. SLM 10% 3 μ l TOA. Akseptorfase: 50 μ l 20mM maursyre. Ekstraksjonstid: 90 min. Ristehastighet 900 rpm (n=3).

Resultater viser at for karbonat-bikarbonatbuffer pH 9,3 var relative respons til alle stoffene dårligere enn andre betingelser. pH i donorfase skal være høyt for å undertrykke ionisering av de basiske stoffene, siden de må være i sin uioniserte form for å ekstraheres fra donorfase til SLM [44]. pKa til stoffene lå i område 7,46-10,9. De fleste stoffene hadde derfor ikke god løselighet i organiske væskemembran når pH i donorfase var 9,3. Dette fører til dårlig utbytte og dermed dårlig relative respons til stoffene.

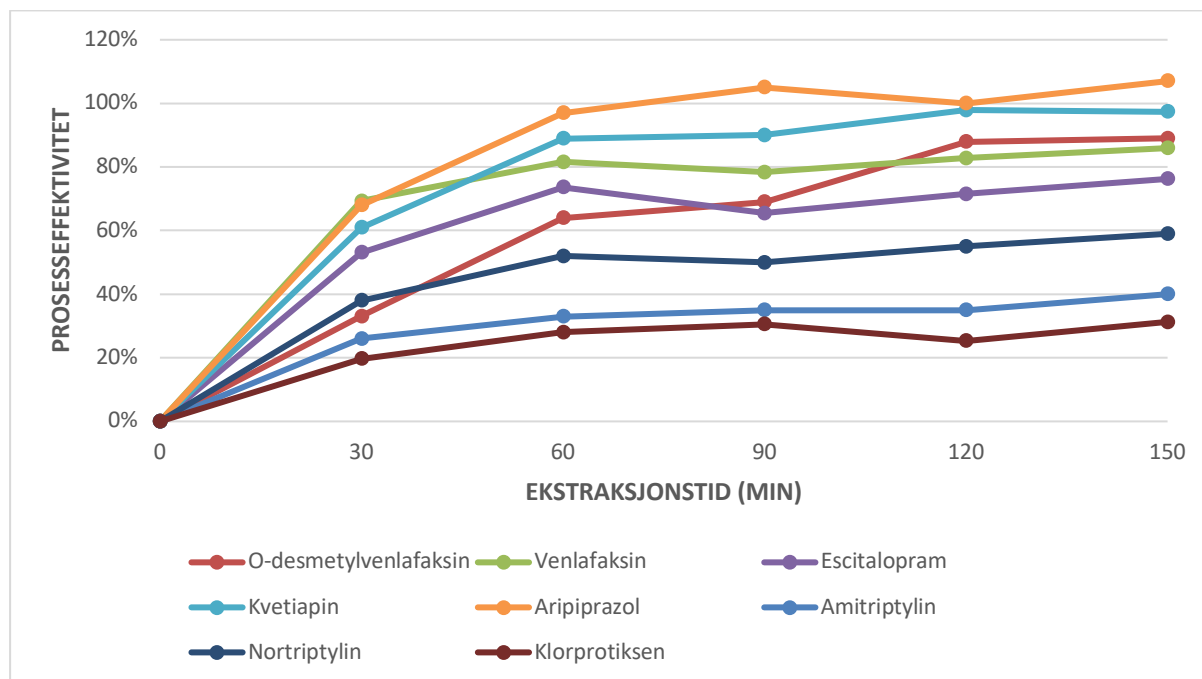
Betingelsen med karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og DMSO ga best relative respons til stoffene i forhold til andre betingelsene. Årsaken kan være at DMSO var et organisk løsemiddel som gjorde donorfase mindre polar slik at adsorpsjon fra VAMS til donorfase ble mer effektiv. En annen hypotese var at DMSO også forhindret adsorpsjon av stoffene til veggen i donorbrønnen i likhet med MeOH. Resultatene viste at den relative responsen fra betingelsen med DMSO var høyere enn betingelsen med MeOH, noen som tyder på at DMSO forhindret adsorpsjon mer effektivt i forhold til MeOH. I tillegg var tippene hvitere sammenlignet med øvrige betingelsene. Betingelsen med karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og DMSO ble derfor brukt videre i optimaliseringsforsøk og metodevurdering.

Ekstraksjonstid

I forsøket ble stoffene ekstrahert med ekstraksjonstider på 30, 60, 90, 120 og 150 minutter. En tidskurve ble laget ved å plote prosesseffektivitet mot ekstraksjonstid (**figur 22**). Tidskurven ble brukt for å undersøke ekstraksjonskinetikk og bestemmelse av optimal ekstraksjonstid.

Det ble observert betydelige lavere PE ved bruk av VAMS i forhold til fullblod uten VAMS. Dette kan skyldes at matriks ikke ble frigjort fullstendig fra VAMS. Etter ekstraksjon ble ikke VAMS helt hvit og det var fortsatt blodspor i tippet til VAMS. Resultatene viste en økning i PE ved økende ekstraksjonstid frem til likevekt ble oppnådd i systemet. Prosesseffektiviteten stabiliserte seg rundt 60-90 minutter, og kurvene flatet seg ut etter 90 minutter. Et unntak var O-desmetylvenlafaksin, hvor PE fortsatt økte ved 60-90 minutter før likevekten ble oppnådd ved 120 minutter. O-desmetylvenlafaksin hadde lavere ekstraksjonshastighet. Dette kan skyldes relativ lav log P-verdi i forhold til de andre analyttene. PE ved ekstraksjonstid på 30 minutter hadde høyest RSD. Det er stor variasjon i PE mellom stoffene. PE til amitriptylin og klorprotiksen lå under 40 % for alle ekstraksjonstider, RSD (5-25%). Dette kan skyldes at disse

stoffene har høy proteinbinding slik at ikke alt stoff kom ut fra matriksen. Siden prosess-effektivitet ikke økte vesentlig etter 60 minutter for de fleste stoffene og for å begrense tidsbruk ble ekstraksjonstiden satt til 60 minutter.



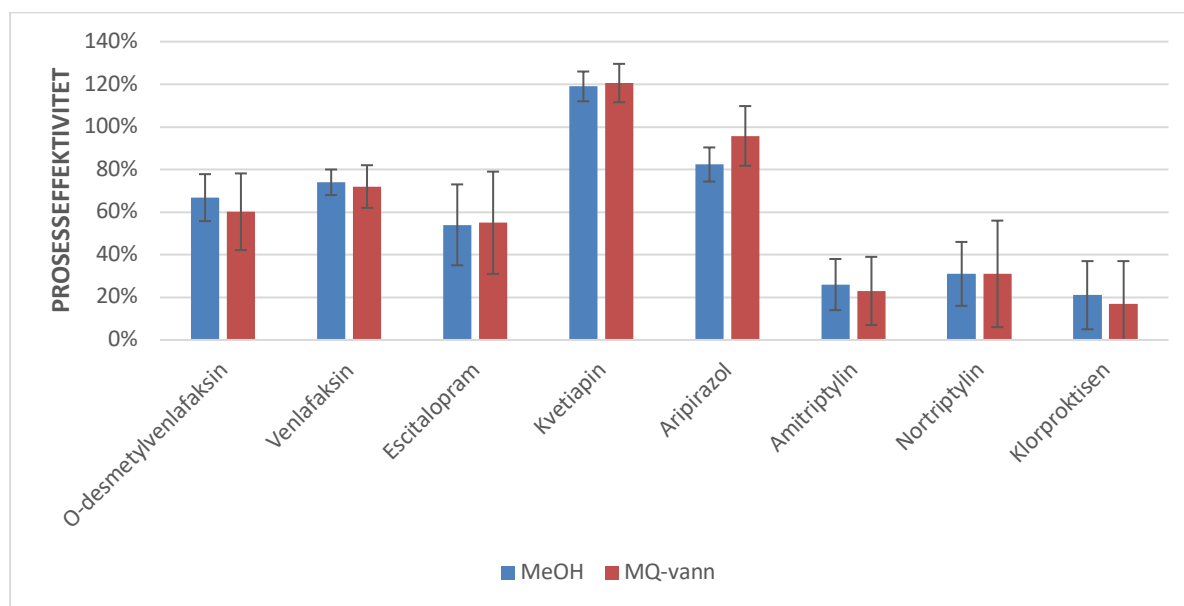
Figur 22: Tidskurven av psykofarmaka og metabolitt ved PALME fra VAMS. Ekstraksjonsbetingelser til donorfase: VAMS med prøveløsning (0,5 µg/ml), 200 µl 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 µl MeOH. SLM 10% TOA. Donorfase: 50 µL 20mM maursyre. Ekstraksjonstid: 30/60/90/120/150 min. Ristehastighet 900 rpm (n=3).

Tabell 4.5 Gjennomsnittlig RSD for prosesseffektivitet til stoffene

Ekstraksjonstid	O-desmetylvenlafaksin	Venlafaksin	Escitalopram	Kvetiapin
30 min	13 %	8 %	21 %	5 %
60 min	6 %	4 %	11 %	14 %
90 min	4 %	14 %	11 %	9 %
120 min	15 %	9 %	14 %	10 %
150 min	2 %	6 %	3 %	8 %
Ekstraksjonstid	Aripiprazol	Amitriptylin	Nortriptylin	Klorprotiksen
30 min	21 %	21 %	25 %	25 %
60 min	10 %	20 %	8 %	19 %
90 min	3 %	8 %	1 %	9 %
120 min	12 %	25 %	17 %	22 %
150 min	7 %	3 %	4 %	2 %

Løsningsmiddel for internstandard

I tidligere forsøk ble internstandard laget i MeOH. Ved tilsatt av internstandard i MeOH vil man kunne få felling av blodet i overflaten av VAMSen. For å evaluere om dette kunne påvirke frigjøring av analytt fra VAMS til donorfasen ble tilsatt MeOH sammenlignet med tilsats av MQ-vann. Resultatene viste at det var ikke noen vesentlig forskjell når VAMS ble tilsatt i MeOH og MQ-vann. Internstandardløsningen ble likevel fortynnet med MQ-vann i forhold 1:4, og den nye IS-løsningen ble brukt i metodevalidering.



Figur 23: Sammenligning mellom VAMS dyppet i MeOH og MQ-vann. Ekstraksjonsbetingelser til donorfase: VAMS med prøveløsning (0,5 µg/mL), 200 µl 0,1M karbonat-bikarbonatbuffer pH 10,5 og 25 µL MeOH. SLM 10% TOA. Donorfase: 50 µL 20mM maursyre. Ekstraksjonstid: 60 min. Ristehastighet 900 rpm (n=3)

Prosesseffektivitet til stoffene

Fra resultatene i **figur 22** og **figur 23** kan det se ut som prosesseffektivitet blir lavere ved høyeste log P og laveste log P. Hypotesen om at høy log P reduserer prosesseffektivitet kan forklares med at fordelingen fra VAMS til vandig medium i donorfase og fordelingen fra SLM til vandig akseptorfase var lave. Siden løselighet til stoffene med høy log P er dårligere i vandige medium. Hypotesen om at lav log P reduserer prosesseffektivitet kan forklares med at fordelingen av stoffene fra donorløsningen til SLM er lav, mengden av stoffene som ekstraheres fra SLM til akseptorløsningen vil da også være lav [63].

Sammenligning mellom EDTA blod og blod fra serumrør uten tilsetningsstoffer

Teoretisk skal fullblod uten tilsetningsstoffer brukes til å lage standardkurver og kontroller hvis man skal ha identisk matriks med en prøve tatt fra fingeren. Det er praktisk umulig å lage standardkurvene og kontrollene med blod uten tilsetningsstoffer siden blodet vil umiddelbart starte å koagulere etter prøvetaking [57]. EDTA-blod ble derfor brukt til å lage standardkurvene og kontrollene i oppgaven. Det er viktig at bruk av tilsetningsstoff ikke påvirker kvantitativ analyse av reelle prøver, og at standarder og kontroller oppfører seg på lik linje med de reelle prøvene under ekstraksjon og analyse [57]. Det var derfor interessant å sammenlikne resultater fra VAMS i EDTA-blod og fra VAMS i fullblod uten tilsetningsstoffer. En annen grunn for sammenlikningen var at de reelle prøvene fra Diakonhjemmet sykehus ble tatt i fullblod fra serumrør uten tilsetningsstoffer. Resultatet i **tabell 4.6** viser at for de fleste stoffene var avvik mellom EDTA-blod og ikke-EDTA-blod lavere enn 20 %. Det kan konkluderes med at det ikke er noen vesentlig forskjell i resultater mellom EDTA-blod og fullblod uten tilsetningsstoffer, og at EDTA-blod kunne brukes til å lage standarder og kontroller.

Tabell 4.6 Sammenlikning utbytte, PE og ME mellom EDTA-blod og blod uten tilsetningsstoffer

Stoff	Type blod	Utbytte		PE		ME	
		K2 50 ng/ml	K4 1500 ng/ml	K2 50 ng/ml	K4 1500 ng/ml	K2 50 ng/ml	K4 1500 ng/ml
O-desmetylvenlafaksin	EDTA	82 %	37 %	60 %	17 %	73 %	45 %
	Ikke EDTA	56 %	34 %	39 %	13 %	70 %	39 %
	Avvik	32 %	8 %	35 %	24 %	4 %	13 %
Venlafaksin	EDTA	81 %	45 %	59 %	21 %	74 %	47 %
	Ikke EDTA	56 %	46 %	52 %	19 %	93 %	42 %
	Avvik	31 %	-2 %	12 %	10 %	-26 %	11 %
Desmetylcitalopram	EDTA	36 %	43 %	24 %	8 %	67 %	20 %
	Ikke EDTA	29 %	35 %	21 %	7 %	73 %	21 %
	Avvik	19 %	19 %	13 %	13 %	-9 %	-5 %
Escitalopram	EDTA	39 %	38 %	37 %	16 %	96 %	42 %
	Ikke EDTA	34 %	41 %	33 %	15 %	95 %	36 %
	Avvik	13 %	-8 %	11 %	6 %	1 %	14 %
Kvetiapin	EDTA	82 %	45 %	121 %	26 %	147 %	57 %
	Ikke EDTA	59 %	53 %	99 %	29 %	168 %	54 %

	Avvik	28 %	-18 %	18 %	-12 %	-14 %	5 %
N-desalkylkvetiapin	EDTA	33 %	42 %	43 %	13 %	131 %	31 %
	Ikke EDTA	27 %	50 %	38 %	14 %	143 %	27 %
	Avvik	18 %	-19 %	12 %	-8 %	-9 %	13 %
Dehydroaripiprazol	EDTA	32 %	254 %	21 %	11 %	65 %	4 %
	Ikke EDTA	13 %	216 %	13 %	11 %	97 %	5 %
	Avvik	59 %	15 %	38 %	0 %	-49 %	-25 %
Aripiprazol	EDTA	44 %	118 %	24 %	15 %	54 %	12 %
	Ikke EDTA	19 %	134 %	15 %	17 %	80 %	12 %
	Avvik	57 %	-14 %	38 %	-13 %	-48 %	0 %
Amitriptylin	EDTA	25 %	19 %	26 %	6 %	104 %	30 %
	Ikke EDTA	18 %	14 %	20 %	4 %	111 %	26 %
	Avvik	28 %	26 %	23 %	33 %	-7 %	13 %
Nortipylin	EDTA	20 %	16 %	22 %	7 %	110 %	45 %
	Ikke EDTA	14 %	20 %	20 %	6 %	139 %	38 %
	Avvik	30 %	-25 %	9 %	14 %	-26 %	16 %
Klorprotiksen	EDTA	11 %	22 %	12 %	8 %	111 %	37 %
	Ikke EDTA	6 %	14 %	9 %	5 %	143 %	34 %
	Avvik	45 %	36 %	25 %	38 %	-29 %	8 %

4.3 Metodevalidering

Siden metabolitter fra analyttene også kan ha betydning for farmakologisk effekt i kroppen [13], og siden metabolittene var inkludert i TDM utført ved laboratoriet på Diakonhjemmet sykehus, ble metabolittene inkludert i metodevalideringen. Det ble gjort en validering av analysemetoden, siden det var første gang en bioanalytisk metode ble utviklet for TDM av psykofarmaka ved bruk av PALME som ekstraksjonsmetode og VAMS som prøvetakingsmetode; og fordi metabolittene var inkludert i metoden [56]. Den optimaliserte metoden ble validert med hensyn på nøyaktighet og presisjon, MDK, MKK, overdrag, linearitet, ekstraksjonsutbytte, PE, matrikseffekt, hematokrit-effekt og spesifisitet.

4.3.1 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon til en metode beskriver hvor like svar man får ved flere analyser av samme prøve. Presisjonen ble angitt som relativt standardavvik (RSD). I legemiddelanalyse er det ønskelig å få høy presisjon. Høy presisjon betyr at standardavviket er lite [64]. Nøyaktighet uttrykker hvor godt analyseresultatet stemmer overens med en referanseverdi, og angis som relativ feil [64]. Presisjon og nøyaktighet ble vurdert ved både innen og mellom-serie i metodevalideringen. I følge EMAs retningslinje for bioanalytisk metodevalidering skal RSD og relativ feil være innenfor 15 % for alle konsentrasjonsnivåer. For prøver nær minste kvantifiserbare konsentrasjon er kravet 20 % [56]. For rettstoksikologiske analyser der det er vanlig å bruke fullblod som prøvemedium finnes det retningslinjer der kravet er 20% for alle nivåer [65]. Siden prøvene er fullblodsprøver og blodvolumet ble absorbert i VAMS er lite, 20 µl, ble kravet til valideringsparametere satt til 20 %.

Presisjon og nøyaktighet innenserie (repeterbarhet)

Tabell 4.7 presenterer resultater for presisjon og nøyaktighet innen serie. Nøyaktighet og presisjon til de syv analyttene og fire metabolittene ble målt ved fire konsentrasjonsnivåer. Det var kun kvetiapin som oppfylte kravet på 15 % for presisjon og nøyaktighet. Når kravet er satt til 20% oppfylte venlafaksin, escitalopram i tillegg til kvetiapin kravet for både presisjon og nøyaktighet. Alle stoffer, bortsett fra kloprotiksen, oppfylte kravet for presisjon, mens det var kun kvetiapin, escitalopram og venlafaksin som oppfylte kravet for nøyaktighet. Dårlig nøyaktighet kunne skyldes systematisk feil i konsentrasjon av stoffene i kontrollene og standardene ved tillaging av prøveløsninger og systematisk feil i analyseinstrumentet under analyse. Nøyaktighet til O-desmetylvenlafaksin og nortriptylin ved de to midterste kontrollene (kontroll 2 og 3) oppfyller kravet på 20%, mens ved høyt konsentrasjonsområde og lavt konsentrasjonsområde (kontroll 1 og 4) oppfylte ikke kravet for nøyaktighet. En mulig forklaring er at stoffene har dårlig linearitet slik at kurvene er mer kvadratisk og den beregnede konsentrasjonen ikke stemmer helt med den reelle konsentrasjonen i prøvene. Metoden hadde høy presisjon. Dette betyr at det kan foretas relativt få analyser av samme prøve uten at dette påvirker nøyaktigheten til resultater, siden det var lite variasjon mellom resultatene fra samme prøve [64].

Tabell 4.7 Presisjon og nøyaktighet innenserie (n=6)

		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
	Teoretisk konsentrasjon	12 ng/ml	50 ng/ml	300 ng/ml	1500 ng/ml
O-desmetylvenlafaksin	Målt konsentrasjon	14,4	46,4	273,0	1157,7
	Nøyaktighet	20 %	-7 %	-9 %	-23 %
	Presisjon	7 %	10 %	6 %	9 %
Venlafaksin	Målt konsentrasjon	12,2	46,1	304,0	1270,2
	Nøyaktighet	1 %	-8 %	1 %	-15 %
	Presisjon	24 %	15 %	19 %	16 %
Escitalopram	Målt konsentrasjon	14,1	49,7	340,8	1206,9
	Nøyaktighet	18 %	-1 %	14 %	-20 %
	Presisjon	5 %	16 %	16 %	16 %
Desmetyl citalopram	Målt konsentrasjon	15,3	55,7	394,9	1405,1
	Nøyaktighet	27 %	11 %	32 %	-6 %
	Presisjon	6 %	10 %	11 %	10 %
N-desalkyl kvetiapiin	Målt konsentrasjon	16,7	32,0	220,2	1134,0
	Nøyaktighet	39 %	-36 %	-27 %	-24 %
	Presisjon	4 %	7 %	8 %	15 %
Kvetiapiin	Målt konsentrasjon	13,4	48,8	338,3	1349,7
	Nøyaktighet	12 %	-2 %	13 %	-10 %
	Presisjon	8 %	10 %	8 %	10 %
Dehydro aripiprazol	Målt konsentrasjon	13,1	36,3	319,8	1527,9
	Nøyaktighet	9 %	-27 %	7 %	2 %
	Presisjon	12 %	8 %	7 %	6 %
Aripiprazol	Målt konsentrasjon	17,8	40,6	355,3	1604,7
	Nøyaktighet	48 %	-19 %	18 %	7 %
	Presisjon	11 %	15 %	8 %	7 %
Amitriptylin	Målt konsentrasjon	15,9	37,8	222,4	1153,4
	Nøyaktighet	33 %	-24 %	-26 %	-23 %
	Presisjon	11 %	19 %	14 %	17 %
Nortriptylin	Målt konsentrasjon	16,7	46,4	272,8	1198,6
	Nøyaktighet	39 %	-7 %	-9 %	-20 %

	Presisjon	15 %	14 %	20 %	17 %
Klorprotiksen	Målt konsentrasjon	17,8	34,3	247,4	1135,8
	Nøyaktighet	48 %	-31 %	-18 %	-24 %
	Presisjon	11 %	18 %	22 %	14 %

Presisjon og nøyaktighet mellomserie (reproduserbarhet)

Resultater i **tabell 4.8** viste at ingen av analyttene og metabolittene oppfylte kravet på 15 % for presisjon og nøyaktighet. Når kravet var satt opp til 20 % oppfylte O-desmetylvenlafaksin, venlafaksin, escitalopram og kvetiapin kravet for presisjon og nøyaktighet. Det var spesielt høy variasjon for n-desalkylkvetiapin, amitriptylin og klorprotiksen. I likhet med innenserien hadde de fleste målingene god presisjon, men dårlig nøyaktighet. Variasjonen og dårlig nøyaktighet kan skyldes av prøvetaking av VAMS som var utsatt for større variasjon enn ved pipettering av prøveløsninger direkte i donorbrønnen. Dersom det var ulike måte på prøvetaking på VAMS kan dette føre til store skjevhet i mellom-serie variasjon. Stor variasjon kan skyldes unøyaktig pipetteringsteknikk, kan være dag til dag variasjon, feil tillaging av standarder og kontroller eller andre ukjente grunner. Feil i tillagingen kan være en årsak til at presisjonen var god, men med dårlig nøyaktighet.

Ny innenserie og flere sett med kontrollene kunne ikke bli utført, siden det ikke var mulig innenfor oppgavens oppfang når universitetet ble stengt pga. tiltak mot koronavirus. Det kan konkluderes at metoden hadde noe dårlig nøyaktighet og relativt god presisjon og det er større variasjon i mellomserie sammenlignet med innenserie. Dette betyr at metoden hadde noe bedre repeterbarhet enn reproduserbarhet. Årsaker til dette er at analyser som utføres på en serie og over kortere periode (innenserie) er mindre utsatt for spredning enn analysere enn analyser som er utført over flere serier og over flere dager [66]. Resultatene er likevel lovende for muligheten til å bruke VAMS og mikroekstraksjon til TDM..

Tabell 4.8 presisjon og nøyaktighet mellom serie (n=16)

		Kontroll 1	Kontroll 2	Kontroll 3	Kontroll 4
	Teoretisk konsentrasjon	12 ng/ml	50 ng/ml	300 ng/ml	1500 ng/ml
O-desmetylvenlafaksin	Målt konsentrasjon	13,4	49,5	303,2	1265,0
	Nøyaktighet	12 %	-1 %	1 %	-16 %

	Presisjon	10 %	8 %	13 %	17 %
Venlafaksin	Målt konsentrasjon	12,8	51,1	334,6	1389,5
	Nøyaktighet	7 %	2 %	12 %	-7 %
	Presisjon	17 %	17 %	21 %	20 %
Escitalopram	Målt konsentrasjon	14,9	45,5	329,5	1295,1
	Nøyaktighet	25 %	-9 %	10 %	-14 %
	Presisjon	10 %	16 %	12 %	17 %
Desmetylcitalopram	Målt konsentrasjon	15,6	50,8	363,7	1440,7
	Nøyaktighet	30 %	2 %	21 %	-4 %
	Presisjon	10 %	15 %	12 %	17 %
N-desalkylkvetiapin	Målt konsentrasjon	16,0	36,8	253,8	1264,7
	Nøyaktighet	34 %	-26 %	-15 %	-16 %
	Presisjon	6 %	22 %	20 %	22 %
Kvetiapin	Målt konsentrasjon	13,7	48,4	319,8	1335,0
	Nøyaktighet	14 %	-3 %	7 %	-11 %
	Presisjon	7 %	9 %	10 %	17 %
Dehydroaripiprazol	Målt konsentrasjon	14,5	39,2	295,0	1469,8
	Nøyaktighet	21 %	-22 %	-2 %	-2 %
	Presisjon	14 %	28 %	12 %	12 %
Aripiprazol	Målt konsentrasjon	18,6	45,5	341,9	1502,6
	Nøyaktighet	55 %	-9 %	14 %	0 %
	Presisjon	20 %	14 %	13 %	17 %
Amitriptylin	Målt konsentrasjon	16,9	46,5	294,8	1409,0
	Nøyaktighet	41 %	-7 %	-2 %	-6 %
	Presisjon	21 %	22 %	25 %	32 %
Nortriptylin	Målt konsentrasjon	15,3	44,4	297,7	1323,7
	Nøyaktighet	27 %	-11 %	-1 %	-12 %
	Presisjon	14 %	13 %	18 %	19 %
Klorprotiksen	Målt konsentrasjon	14,7	34,8	285,3	1271,7
	Nøyaktighet	23 %	-30 %	-5 %	-15 %
	Presisjon	19 %	22 %	21 %	30 %

4.3.2 Minste detekterbare konsentrasjon (MDK)

Minste detekterbare konsentrasjon er den laveste konsentrasjon av analytt i en prøve, som kan detekteres med sikkerhet med den bioanalytiske metoden [67]. For undersøkelse av MDK ble en fortynningsrekke av laveste konsentrasjon ekstrahert. Fortynningsrekken var i området 0,25-5 ng/ml. Signal til støy på tre er et vanlig mål for MDK. Resultater fra **tabell 4.9** viser at flere av stoffene hadde klare kromatografiske topper med lav bakgrunn/støy ved de laveste konsentrasjonene. Det var observert sterke signaler ved 40 ganger fortynning av laveste standard for kvetiapin, desmetylcitalopram, nortriptylin og O-desmetylvenlafaksin. Det var tidsbegrensninger og MDK for de øvrige stoffene ved enda lavere konsentrasjoner ble derfor ikke undersøkt. Aripiprazol og klorprotiksen skilte seg ut, der var MDK lik konsentrasjon av den laveste standard (10 ng/ml), mens MDK for dehydroaripiprazol og n-desalkylkvetiapin var på 5 ng/ml og MDK for escitalopram , amitriptylin og venlafaksin var på 0,5 ng/ml.

Tabell 4.9 Minste detekterbare konsentrasjon til stoffene oppgitt i ng/ml

Stoffnavn	Minste detekterbare konsentrasjon (ng/ml)
Aripiprazol	10
Amitriptylin	0,5
Desmetylcitalopram	0,25
Dehydroaripiprazol	5
Escitalopram	0,5
Klorprotiksen	10
Kvetiapin	0,25
N-desalkylkvetiapin	5
Notriptylin	0,25
O-desmetylvenlafaksin	0,25
Venlafaksin	0,5

4.3.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) uttrykker den laveste konsentrasjon av analytt i fullblod som kan bestemmes med akseptabel presisjon og nøyaktighet, hvor både RSD og relative feil bør være innenfor $\pm 20\%$ [56]. Det er også vanlig å bestemme MKK fra signal-til

støy-forhold (S/N-forhold) , hvor S/N er lik 10 [67]. Siden S/N-forhold var større enn 10 for alle stoffene, og fullblod ble benyttet som analysemedium, ble MKK bestemt med hensyn til nøyaktighet og presisjon.

MKK for stoffene er presentert i **tabell 4.10**. Minste kvantifiserbare konsentrasjon lå i område 12-300 ng/ml. I følge EMA sin retningslinje for validering av bioanalytisk metode bør MKK bli satt til konsentrasjon for kontroll 1 [56]. På grunn av dårlig presisjon og nøyaktighet ved kontroll 1 ble MKK for flere stoff satt til kontroll 2 eller 3. O-desmetylvenlafaksin, venlafaksin, klorprotiksen og kvetiapin har laveste deteksjonsgrense, noe som betyr at metoden har bedre sensitivitet for de tre stoffene enn øvrige stoffene. Analyse av flere serier kunne endret resultatet og dermed ført til lavere MKK for flere stoff, der nøyaktighet og presisjon lå nær grensen på ± 20 %. Minste kvantifiserbare konsentrasjon ble sammenlignet med referanseområder. Referanseområdene ble hentet fra nettsiden til Senter for psykofarmakologi, Diakonhjemmet sykehus. For de fleste stoffene lå MMK nær den nedre referansegrensen. Unntak fra dette var MMK for escitalopram, hvor MKK for escitalopram er høyere enn den øvrige referansegrenser. Dette var uønsket innenfor TDM, hvor nøyaktighet for kvantitativ analyse er svært viktig. Den metoden var derfor ikke egnet for TDM av stoffet. Hvis man absolutt må bruke denne metoden skal man regne med at det er større usikkerhet for resultater i laveste enn høyeste konsentrasjonsnivåer.

Tabell 4.10 Minste kvantifiserbare konsentrasjon til stoffene oppgitt i ng/ml

Stoffnavn	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (ng/ml)	Referanseområder (ng/ml)[68]
Aripiprazol	50	90-600
Amitriptylin	50	80-210
Escitalopram	50	6-40
Kvetiapin	12	20-300
Desmetylcitalopram	50	-
Dehydroaripiprazol	300	-
N-desalkylkvetiapin	300	-
Nortriptylin	50	50-160
O-desmetylvenlafaksin	12	-
Venlafaksin	12	100-500

Klorprotiksen	12	3-30
---------------	----	------

"" betyr finnes ikke noen referanseområde

4.3.4 Overdrag

Begrepet overdrag benyttes når det forekommer en betydelig topp i en blank prøve som injiseres etter en prøveløsning med høy konsentrasjon. Under metodevalidering bør overdrag i LC-MS/MS instrumentet bli undersøkt [69]. Overdrag kan gi falske positive resultater med konsentrasjon rundt MKK. Falske positive resultater kan påvirke deteksjon og kvantitativ bestemmelse av stoffene. Overdrag ble bestemt ved å injisere to blankprøver etter injeksjon av prøve med høy konsentrasjon (standard 6), og signalintensitet til analytt i blankprøven bør ikke være over 20 % av signalintensitet av minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) [56]. Det ble ikke observert noen topp i kromatogrammene for escitalopram, desmetylcitalopram, dehydroaripiprazol, n-desalkylkvetiapin og klorprotiksen. For amitriptylin og venlafaksin hadde toppene i blank prøvene kjørt etter standard 6 (blankprøve med IS, 0⁺) lik areal med toppene som finnes i blankprøve som ble kjørt i begynnelsen av serien (blankprøve uten IS, 0). Toppene ble derfor ansett som bakgrunn i analyseinstrumentet. Derfor ble ikke toppene regnet som overdrag, selv om resultatet var utenfor grensen. Det kan konkluderes at overdragstesten oppfylte kravet. Dette betyr at prøve av høyeste standard til stoffene kan analyseres uten overdrag. For reelle prøver med evt. enda høyere konsentrasjoner bør en ny injeksjon av påfølgende prøve vurderes ved rutineanalyse. Toppen for amitriptylin og venlafaksin ved blankprøve forekom i alle serier og kan gi større usikkerhet ved kvantitativ analyse på laveste konsentrasjonsnivå. For å unngå usikkerheten bør MKK for stoffene settes til høyere konsentrasjonsnivåer.

Tabell 4.11 Overdrag i forhold til minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

Stoffnavn	MKK (ng/ml)	Overdrag i blank 1	Overdrag blank 2
Aripiprazol	50	9 %	9 %
Amitriptylin	50	29 %	27 %
Escitalopram	50	-	-
Kvetiapin	12	6 %	6 %
Desmetylcitalopram	50	-	-

Dehydroaripiprazol	300	-	-
N-desalkylkvetiapin	300	-	-
Nortriptylin	50	11 %	17%
O-desmetylvenlafaksin	12	3 %	3 %
Venlafaksin	12	31 %	29 %
Klorprotiksen	300	-	-

“-” betyr det finnes ikke noen topp i blankprøve

4.3.5 Linearitet

Lineariteten for analyttene ble bestemt på tre ulike serier ved hjelp av en kalibreringskurve med seks konsentrasjonsnivåer med 1/x vektning. Konsentrasjonsområdet var fra 10-2000 ng/ml som dekket terapeutisk område for fleste stoffene, bortsett fra klorprotiksen og escitalopram som har nedre referansegrense på henholdsvis 3 og 6 ng/ml. For flere av stoffene var det ikke mulig med en lineær modell, og aripiprazol, escitalopram, desmetylcitalopram, dehydroaripiprazol, nortriptylin og klorprotiksen ble beregnet ved hjelp av kvadratisk tilpasning. Gjennomsnitt for korrelasjonskoeffisienten r^2 i seriene ble beregnet. **Tabell 4.12** oppsummerer r^2 i hver serie og gjennomsnittet av seriene. Korrelasjonskoeffisienten bør helst ha en verdi på 0,999, men avhengig av hva metoden skal brukes til kan lavere verdier aksepteres i noen tilfeller og linearitet dokumenteres ved lineær regresjon [70]. Resultater viser at kalibreringskurvene til aripiprazol, desmetylcitalopram, dehydroaripiprazol, venlafaksin og klorprotiksen hadde en kurvetilpasning hvor gjennomsnittlig $r^2 \geq 0,99$. For amitriptylin og escitalopram var linearitet til to av de tre seriene større enn 0,99, mens lineariteten til en serie ikke oppfylte kravet. Dette kan forklares at instrumentet hadde ulik respons på stoffene over tid siden seriene ble kjørt ulike dager. Kvetiapin, n-desalkylkvetiapin, nortriptylin og O-desmetylvenlafaksin hadde dårlig linearitet med $R^2 < 0,99$. Dette kan føre til noe mer upresis kvantifisering av stoffene.

Tabell 4.12 Linearitet til stoffene

Stoffnavn	Internstandard	r^2 Serie 1	r^2 Serie 3	r^2 Serie 4	r^2 Gjennom- snitt
Aripiprazol*	Kvetiapin d8	0,996	0,9950	0,997	0,996
Amitriptylin	Amitriptylin d3	0,995	0,992	0,981	0,989
Escitalopram *	Citalopram d6	0,985	0,991	0,991	0,989

Kvetiapin	Kvetiapin d8	0,976	0,991	0,989	0,985
Desmetylcitalopram*	Citalopram d6	0,993	0,993	0,995	0,994
Dehydroaripiprazol*	Kvetiapin d8	0,996	0,991	0,998	0,995
N-desalkylketiapin	Kvetiapin d8	0,972	0,984	0,978	0,978
Nortriptylin*	Nortriptylin d3	0,981	0,984	0,991	0,985
O-desmetylvenlafaksin	O-desmetylvenlafaksin d6	0,987	0,991	0,976	0,985
Venlafaksin	Venlafaksin d6	0,984	0,994	0,992	0,990
Klorprotiksen *	Notriptylin d3	0,988	0,989	0,997	0,991

*For stoffene som merkes med * ble kvadratisk kurve brukt for beregninger.*

4.3.6 Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet, matrikseffekt

Ekstraksjonsutbytte

Validering av ekstraksjonsutbytte anbefales ved utvikling av metoder hvor ekstraksjon er benyttet som prøveopparbeidelse [69]. Utbyttet skal også bestemmes ved utvikling av nye ekstraksjonsmetoder, siden det kan være fare for tap av analytt under ekstraksjonen [32]. Ekstraksjonsutbyttet ble bestemt ved to konsentrasjonsnivåer og fra fire donorer og tre ulike HT-nivåer av donor 1. Resultat av ekstraksjonsutbyttene er presentert i **tabell 4.13**. RSD ble ikke tatt med i tabellen siden det var utført kun en parallell av hver prøve.

Stoffene har varierende ekstraksjonsutbytte. Ekstraksjonsutbyttet for de to kontrollene lå i området 6-322 %. Ekstraksjonsutbyttet til dehydroaripiprazol ved kontroll 4 lå i området 86-322 %. Dette var vanskelig å forklare. Kun O-desmetylvenlafaksin, venlafaksin og kvetiapiin hadde ekstraksjonsutbytte over 50 %. Til sammenligning var ekstraksjonsutbytte for stoffene fra VAMS lavere enn fullblod uten VAMS. Dette kan skyldes at stoffene lettere ekstraheres fra fullblod prøveløsning uten VAMS enn fra VAMS og at det var dårlig desorpsjon av stoffene fra VAMS til donorfase. Siden det ble utført en parallell for hver prøve i validering av ekstraksjonsutbytte, og det var vanskelig å vurdere om sammenheng mellom ekstraksjonsutbytte og konsentrasjon, burde det utføres et forsøk for å studere om ekstraksjonsutbyttet er konsentrasjonsavhengig og et forsøk for å sammenligne ekstraksjonsutbytte mellom fullblod uten VAMS og fullblod i VAMS. Dette var ikke mulig i oppgavens omfang. Relativt avvik til ekstraksjonsutbytte mellom donorene lå i området 15-55 %. Variasjonen kan forklares av ulike HT-nivåer til donorene. Variasjonen kan også skyldes feil tillaging av prøver og kontroller og dårlig teknikk ved prøvetaking av VAMS.

I forsøket ble prosesseffektivitet beregnet. Resultater viser at prosesseffektivitet lå i området 7-150 % ved kontroll 2, mens prosesseffektivitet lå i området 5-37 % ved kontroll 4. Prosesseffektivitet i kontrollene avviker fra hverandre. Dette kan skyldes at feil tillaging av eksterstandarder og/eller feiltillaging av prøvene. Sammenlignet med PE for stoffene i fullblod uten VAMS var PE for stoffene i VAMS noe lavere. Det burde utføres et forsøk for å sammenligne PE i fullblod uten VAMS og fullblod med VAMS.

Matrikseffekt

Matrikseffekter er en viktig parameter som bør vurderes i validering ved bruk av massespektrometriske metoder [56]. Matrikseffekter forekommer ofte i LC/MS-MS og kan forårsake undertrykking eller forsterking av signalintensitet til analytt. Dette kan påvirke andre valideringsparametere som nøyaktighet, presisjon, MDK, MKK og linearitet [67]. I oppgaven ble matrikseffekter fra fire ulike batcher fullblod undersøkt på to konsentrasjonsnivåer og Matuszewskis metode benyttet for å bestemme matrikseffekt [55]. Verdier over 100 % tyder på forsterket ioneintensitet, mens verdier under 100 % indikerer undertrykket ioneintensitet [71]. Matrikseffekt skal vanligvis ligge i området 80-120%. I følge retningslinjene skal RSD mellom batchene være innenfor 15 % [56, 57]. Det ble bestemt at kravet til RSD skal være 20% i oppgaven, siden det var første gang VAMS ble benyttet for kvantitativ bestemmelse av psykofarmaka. Resultat representert i **Tabell 4.13** viser at ME lå i området 42-184% ved lav konsentrasjonsnivå og 3-66% ved høy konsentrasjonsnivåer. RSD var innenfor grensen på 20 % for de fleste stoffer, bortsett fra RSD ved kontroll 4 for dehydroaripiprazol og aripiprazol. Ved det lave konsentrasjonsnivået var kun ME til escitalopram og amitriptylin innenfor området 80-120%. Ved høy konsentrasjonsnivået oppfylte ingen stoff kravet. Dårlig ME kan skyldes av feil tillaging av eksterstandard til kontrollene, feil teknikk ved prøvetaking av VAMS, eller reell matrikseffekt. Nytt forsøk med matrikseffekter kunne vært utført, men det var ikke mulig innenfor oppgavens omfang.

Tabell 4.13 Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt for stoffene

Analytt	Donor	Kontroll 2 50 ng/ml			Kontroll 4 1500 ng/ml		
		Utbytte	PE	ME	Utbytte	PE	ME
O-desmetylvenlafaksin	Donor 1 HT 0,4	60 %	48 %	81 %	78 %	28 %	36 %
	Donor 2	62 %	42 %	69 %	52 %	20 %	39 %
	Donor 3	82 %	60 %	73 %	37 %	37 %	17 %

	Donor 4	49 %	43 %	42 %	42 %	18 %	42 %
	Donor 1 HT 0,6	59 %	48 %	81 %	27 %	12 %	44 %
	Donor 1 HT 0,2	85 %	64 %	75 %	23 %	9 %	41 %
	Giennomsnitt	66 %	51 %	78 %	40 %	16 %	42 %
	RSD	22 %	17 %	9 %	52 %	43 %	8 %
Venlafaksin	Donor 1 HT 0,4	56 %	47 %	84 %	66 %	26 %	39 %
	Donor 2	64 %	42 %	66 %	57 %	21 %	37 %
	Donor 3	81 %	59 %	74 %	45 %	21 %	47 %
	Donor 4	54 %	39 %	71 %	58 %	26 %	44 %
	Donor 1 HT 0,6	82 %	48 %	59 %	60 %	25 %	42 %
	Donor 1 HT 0,2	90 %	73 %	82 %	76 %	23 %	30 %
	Giennomsnitt	71 %	52 %	73 %	55 %	22 %	41 %
	RSD	21 %	25 %	13 %	29 %	21 %	15 %
Escitalopram	Donor 1 HT 0,4	39 %	34 %	89 %	46 %	17 %	38 %
	Donor 2	39 %	30 %	77 %	46 %	18 %	38 %
	Donor 3	39 %	37 %	96 %	38 %	16 %	42 %
	Donor 4	37 %	31 %	83 %	64 %	23 %	36 %
	Donor 1 HT 0,6	32 %	27 %	84 %	32 %	17 %	54 %
	Donor 1 HT 0,2	50 %	53 %	107 %	58 %	24 %	42 %
	Giennomsnitt	39 %	35 %	19 %	43 %	19 %	43 %
	RSD	15 %	27 %	12 %	30 %	20 %	16 %
Desmetylcitalopram	Donor 1 HT 0,4	35 %	24 %	67 %	56 %	11 %	20 %
	Donor 2	34 %	19 %	55 %	54 %	11 %	20 %
	Donor 3	36 %	24 %	67 %	43 %	8 %	20 %
	Donor 4	33 %	21 %	62 %	48 %	10 %	22 %
	Donor 1 HT 0,6	33 %	20 %	59 %	33 %	9 %	27 %
	Donor 1 HT 0,2	57 %	39 %	68 %	49 %	10 %	21 %
	Giennomsnitt	38 %	24 %	63 %	43 %	9 %	23 %
	RSD	24 %	30 %	8 %	29 %	19 %	18 %
N-desalkylkvetiapin	Donor 1 HT 0,4	24 %	38 %	159 %	57 %	15 %	26 %
	Donor 2	21 %	31 %	147 %	34 %	12 %	36 %
	Donor 3	33 %	43 %	131 %	42 %	13 %	31 %
	Donor 4	24 %	34 %	145 %	50 %	14 %	28 %
	Donor 1 HT 0,6	22 %	30 %	135 %	32 %	10 %	32 %
	Donor 1 HT 0,2	42 %	55 %	132 %	41 %	14 %	34 %
	Giennomsnitt	28 %	39 %	142 %	40 %	12 %	31 %
	RSD	29 %	24 %	8 %	27 %	22 %	11 %
Kvetiapin	Donor 1 HT 0,4	48 %	88 %	184 %	61 %	28 %	47 %
	Donor 2	45 %	83 %	183 %	39 %	22 %	57 %
	Donor 3	82 %	121 %	147 %	45 %	26 %	57 %
	Donor 4	58 %	106 %	182 %	55 %	27 %	49 %
	Donor 1 HT 0,6	48 %	77 %	162 %	32 %	18 %	57 %
	Donor 1 HT 0,2	94 %	150 %	159 %	42 %	21 %	50 %
	Giennomsnitt	63 %	104 %	170 %	42 %	22 %	55 %
	RSD	33 %	26 %	9 %	34 %	25 %	12 %

Dehydroaripiprazol	Donor 1 HT 0,4	15 %	13 %	88 %	322 %	11 %	3 %
	Donor 2	16 %	12 %	75 %	181 %	7 %	4 %
	Donor 3	32 %	21 %	65 %	254 %	11 %	4 %
	Donor 4	18 %	14 %	79 %	289 %	12 %	4 %
	Donor 1 HT 0,6	13 %	10 %	78 %	86 %	8 %	9 %
	Donor 1 HT 0,2	45 %	34 %	74 %	179 %	9 %	5 %
	Giennomsnitt	23 %	17 %	77 %	203 %	9 %	5 %
	RSD	55 %	50 %	10 %	43 %	27 %	36 %
Aripiprazol	Donor 1 HT 0,4	27 %	19 %	71 %	97 %	10 %	10 %
	Donor 2	19 %	14 %	74 %	96 %	10 %	11 %
	Donor 3	44 %	24 %	54 %	118 %	15 %	12 %
	Donor 4	34 %	22 %	66 %	100 %	15 %	15 %
	Donor 1 HT 0,6	22 %	14 %	63 %	54 %	11 %	20 %
	Donor 1 HT 0,2	69 %	40 %	59 %	90 %	15 %	17 %
	Giennomsnitt	36 %	22 %	65 %	87 %	12 %	14 %
	RSD	52 %	44 %	12 %	28 %	27 %	26 %
Amitriptylin	Donor 1 HT 0,4	13 %	13 %	102 %	20 %	7 %	33 %
	Donor 2	15 %	17 %	108 %	14 %	4 %	31 %
	Donor 3	25 %	26 %	104 %	19 %	6 %	30 %
	Donor 4	17 %	21 %	126 %	25 %	7 %	28 %
	Donor 1 HT 0,6	17 %	18 %	102 %	15 %	5 %	37 %
	Donor 1 HT 0,2	24 %	26 %	106 %	13 %	5 %	36 %
	Giennomsnitt	19 %	20 %	108 %	16 %	5 %	33 %
	RSD	27 %	26 %	8 %	36 %	31 %	10 %
Nortriptylin	Donor 1 HT 0,4	16 %	19 %	123 %	28 %	10 %	37 %
	Donor 2	15 %	19 %	132 %	16 %	8 %	47 %
	Donor 3	20 %	22 %	110 %	16 %	7 %	45 %
	Donor 4	13 %	17 %	134 %	20 %	11 %	52 %
	Donor 1 HT 0,6	16 %	18 %	117 %	22 %	9 %	41 %
	Donor 1 HT 0,2	22 %	26 %	119 %	22 %	9 %	42 %
	Giennomsnitt	17 %	20 %	122 %	19 %	8 %	43 %
	RSD	19 %	15 %	7 %	27 %	25 %	12 %
Klorprotiksen	Donor 1 HT 0,4	6 %	7 %	120 %	31 %	9 %	28 %
	Donor 2	6 %	8 %	131 %	18 %	6 %	33 %
	Donor 3	11 %	12 %	111 %	22 %	8 %	37 %
	Donor 4	6 %	8 %	136 %	28 %	10 %	36 %
	Donor 1 HT 0,6	5 %	7 %	128 %	23 %	7 %	30 %
	Donor 1 HT 0,2	11 %	13 %	122 %	18 %	6 %	35 %
	Giennomsnitt	7 %	9 %	125 %	21 %	7 %	33 %
	RSD	34 %	29 %	7 %	32 %	30 %	9 %

4.3.7 Hematokrit effekt

Siden hematokrit-nivået vil kunne påvirke ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt ble hematokrit-effekt tatt med i metodevalideringen. Tre hematokrit-nivåer (lavt (0,2), medium (0,4) og høy

(0,6)) ble evaluert med hensyn til ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt. Det ble også regnet avvik i ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt mellom medium HT-nivået (0,40) og øvrige HT-nivåene. Testen er tilfredsstillende når avviket er innenfor 15 % [57]. Resultat i **tabell 4.13** viser at HT-effekt hadde innvirkning på ekstraksjonsutbytte til stoffene ved det lave konsentrasjonsnivået, hvor ekstraksjonsutbytte var lavere ved høyere HT-nivåer. Dette har også blitt observert ved tidligere forsøk og kan skyldes av høyere antall av røde blodceller ved høyere HT-nivåer som kunne fange stoffene i porene i tippet til VAMS [9]. Observasjon på at ekstraksjonsutbytte til stoffene ble lavere ved høyere proteinbindingsgrad støtter også denne forklaringen. **Tabell 4.14** viser at det var store avvik i verdiene mellom medium HT-nivå og øvrige HT-nivåer. Avvikene kan forklares av stor variasjon i antall rødeblodceller i analysemedium og variasjon i proteinbindingsgrad til stoffene. Avvikene kan også skyldes feil prøvetaking teknikk av VAMS, unøyaktig ved pipettering eller feil laget av enten standarder, kontroller eller eksternt standard.

Tabell 4.14 Avvik mellom medium HT-nivå og øvrige HT-nivåer med hensyn til ekstraksjonsutbytte og matrikseffekt.

Stoff	Hematokrit-nivå	Utbytte		Matrikseffekt	
		K2 50 ng/ml	K4 1500 ng/ml	K2 50 ng/ml	K4 1500 ng/ml
O-desmetylvénlafaksin	Høy 0,6	-2 %	-65 %	0 %	22 %
	Lav 0,2	42 %	-86 %	25 %	-74 %
Venlafaksin	Høy 0,6	46 %	-9 %	-30 %	8 %
	Lav 0,2	50 %	-53 %	37 %	-81 %
Desmetylcitalopram	Høy 0,6	-6 %	15 %	-12 %	35 %
	Lav 0,2	-5 %	-74 %	13 %	-87 %
Escitalopram	Høy 0,6	-18 %	-41 %	-6 %	42 %
	Lav 0,2	-17 %	-69 %	78 %	-74 %
Kvetiapin	Høy 0,6	0 %	-48 %	-12 %	21 %
	Lav 0,2	57 %	-74 %	165 %	-69 %
N-desalkylkvetiapin	Høy 0,6	-8 %	-44 %	-15 %	23 %
	Lav 0,2	-30 %	-74 %	120 %	-79 %
Dehydroaripiprazol	Høy 0,6	-13 %	-73 %	-11 %	200 %
	Lav 0,2	-25 %	12 %	23 %	-97 %
Aripiprazol	Høy 0,6	-19 %	-44 %	-11 %	100 %
	Lav 0,2	15 %	-44 %	-2 %	-89 %

Amitriptylin	Høy 0,6	31 %	-25 %	0 %	12 %
	Lav 0,2	-60 %	-92 %	77 %	-78 %
Nortriptylin	Høy 0,6	0 %	-21 %	-5 %	11 %
	Lav 0,2	-63 %	-86 %	98 %	-74 %
Klorprotiksen	Høy 0,6	-17 %	-26 %	7 %	7 %
	Lav 0,2	-82 %	-89 %	103 %	-78 %

4.3.8 Spesifisitet

Spesifisitet defineres som analysemetodens evne til å detektere og kvantifisere analyttene uten interferens fra andre substanser som kan forventes å være til stede i prøven. Mulig interferens kan stamme fra komponenter eller stoff som normalt er til stede i analysemedium. Interferens kan være metabolitter av legemidlet, andre legemidler og metabolittene av disse [70]. Ettersom interferensene kan gi falske positive responser, som igjen kan føre til feilestimerte resultater, bør analysemetoden hindre muligheten for falsk respons.

Metodens spesifisitet ble bestemt ved å ekstrahere seks spesifisitetløsninger. Oppskriften for tillaging av løsningene beskrives i **punkt 3.9.9**. Løsningene inneholdt totalt 39 forbindelser. Konsentrasjon av forbindelsene i blod er vist i **vedlegg 4**. Det ble ikke funnet respons fra andre forbindelser med samme intensitet og retensjonstid for analyttene. Detektorresponsen kom kun fra analyttene og ikke ble påvirket av noe annet stoff. Det kan dermed konkluderes at metoden var spesifikk.

4.4 Analyse av reelle prøver

Det ble gjort analyse av 20 reelle prøver som inneholdt O-desmetylvenlafaksin, venlafaksin, kvetiapin, n-desalkylkvetiapin, escitalopram, desmetylcitalopram, aripiprazol, dehydro-aripiprazol og amitriptylin ved Farmasøytisk institutt. Resultatene ble sammenlignet med analyser ved Senter for Psykofarmakologi ved Diakonhjemmet sykehus. Funnet konsentrasjon av stoffene i VAMS analysert i ulike tidspunkter ble også sammenlignet. Kalibreringskurvene besto av kalibratorer med konsentrasjon 10-2000 ng/ml.

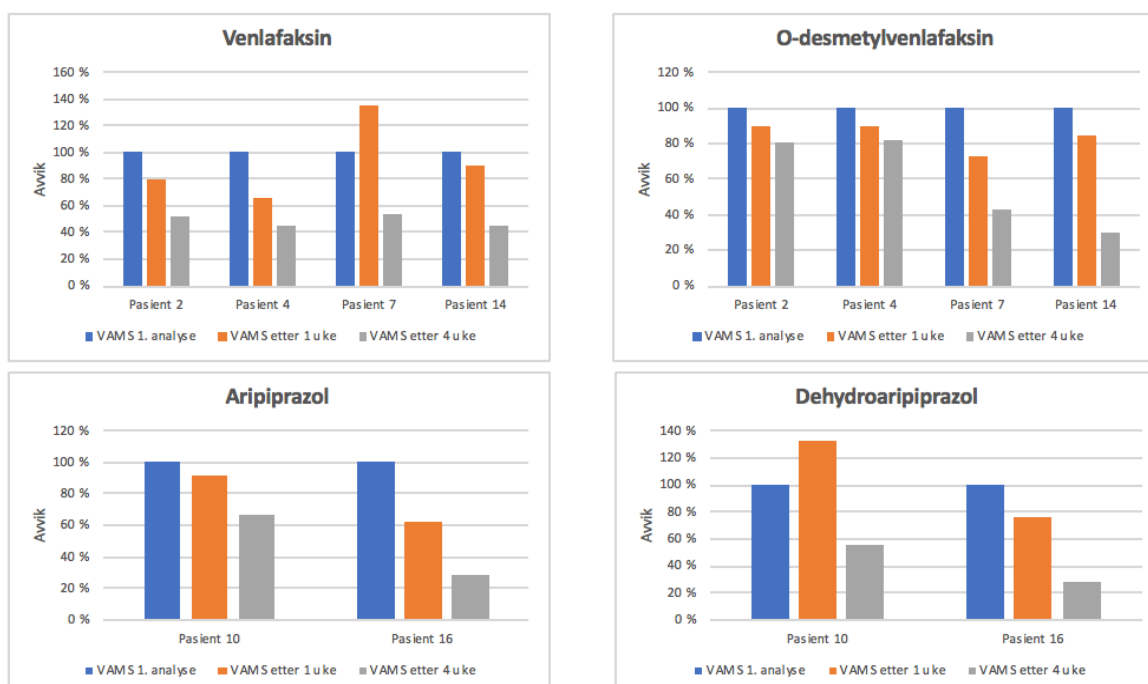
Resultater fra SFP fra analyse av plasma er ikke nødvendigvis direkte sammenlignbare med fullblodprøver samlet inn med VAMS. Resultatene fra analysene utført ved de ulike laboratoriene ved kvantitativ bestemmelse av analyttene viste god overensstemmelse i hvilke

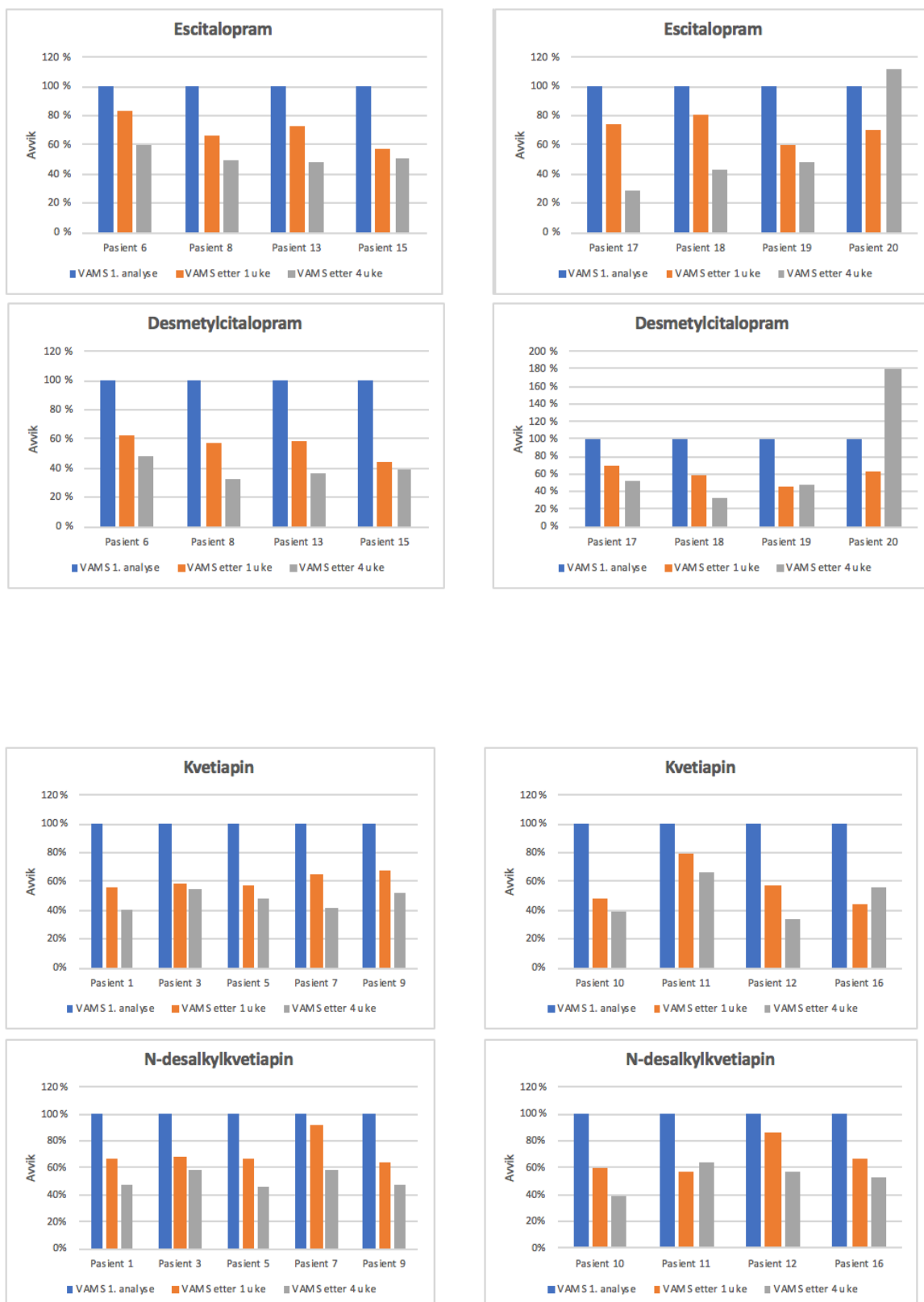
stoffer som ble funnet, men avvik i målt konsentrasjon (**tabell 4.15**). Konsentrasjon av kvetiapin, venlafaksin og O-desmetylvenlafaksin i VAMS og serum hadde ganske god overensstemmelse, hvor avviket var under 40 %. Konsentrasjon av n-desalkylkvetiapin i VAMS er noe lavere enn konsentrasjon i serum, mens konsentrasjon av escitalopram og desmetylcitalopram er betydelig høyere i VAMS sammenlignet med serum. For aripiprazol og metabolitten, dehydroaripiprazol ble det kun to pasientprøver analysert og det var der for lite data for å trekke konklusjon. Variasjonen kan skyldes forskjellige prøveopparbeidelsesmetoder, ulike analyseinstrumenter, ulike operatører som har utført analysene og at prøvene ble analysert med to ulike metode med ulike standardkurver på ulikt tidspunkt. Det var mellom 1-2 dager fra innsamling av VAMS-prøver på SFP til analyse av første VAMS på FI. Denne tiden svarer til den tiden fra pasienten tar VAMS-prøve hjemme til transport via posten til laboratorium i virkelighet. Amitriptylin og dets metabolitt var funnet hos pasienten 17 i følge resultater fra SFP. Disse ble ikke funnet i VAMS-prøvene som ble kjørt ved FI. Dette kan skyldes at metoden brukt ved FI var ikke sensitiv nok for amitriptylin, hvor toppen til amitriptylin forekom i blank prøveblankprøve og MMK var 50 ng/ml som er relativ høyt. En annen mulig forklaring er at analytten ble ekstrahert fra to ulike prøvemedium, serum og fullblod og dette kan føre til variasjon mellom resultater. I et tidligere forsøk har det blitt observert at det er signifikant forskjell for både ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt mellom serum og fullblod for amitriptylin. Forskjellen skyldes av fravær av fibrinogen i serum i forhold til fullblods [72]. I ettertid kunne vi har fått en serum prøve fra SFP og kjøre serum prøve med analysemetoden som brukte til VAMS for å undersøke avvik mellom prøvene. Dette ble ikke gjort siden farmasibygningen var stengt i forbindelse med koronaviruset.

Tabell 4.15 Sammenligning av resultater fra serum og VAMS (gitt i enheten nmol/l som brukes av SFP)

	Serum- resultat (nmol/l)	VAMS- resultat (nmol/l)	Avvik		Serum- resultat (nmol/l)	VAMS- resultat (nmol/l)	Avvik
Kvetiapin	460	347	-25 %	N-desalkylkvetiapin	526	282	-46 %
	171	144	-16 %		280	150	-46 %
	317	266	-16 %		508	308	-39 %
	322	268	-17 %		308	184	-40 %
	61	60	-2 %		200	161	-19 %
	45	38	-16 %		949	554	-42 %
	73	70	-4 %		47	58	22 %
	187	154	-18 %		112	103	-8 %
Venlafaksin	140	91	-35 %	O- desmetylvenlafaksin	1063	763	-28 %
	121	81	-33 %		458	364	-21 %
	183	167	-9 %		1263	1144	-9 %
	440	362	-18 %		1420	1339	-6 %
Escitalopram	26	57	118 %	Desmetylcitalopram	22	61	178 %
	20	55	174 %		25	75	202 %
	49	71	45 %		29	71	144 %
	17	48	183 %		12	47	292 %
	29	58	100 %		35	81	132 %
	62	114	84 %		24	91	279 %
	54	103	91 %		19	69	265 %
	40	85	113 %		41	111	171 %
Aripiprazol	352	371	5 %	Dehydroaripiprazol	136	164	21 %
	183	285	56 %		54	107	98 %

Det var også avvik i resultater mellom analyser av hver reelle prøver, der var avvik mellom først VAMS og VAMS analysert etter fire uker var større enn 40 % for de fleste stoffene. Fullblodet koagulerte umiddelbart etter prøvetaking slik at sammensetningene av fullblod som ble absorbert i VAMS-prøvene ikke ble helt identiske, og det ble mer serum i prøveglasset underveis. En studie har sammenlignet validering av kvantitativ analyse av 33 antidepressiva i fullblod, plasma og serum. Det var ikke signifikant forskjell i utbytte, PE og ME i fullblod sammenlignet med serum for o-desmetylvenlafaksin, venlafaksin og nortriptylin, med unntak for amitriptylin [72]. For psykotika, kvetiapin og aripiprazol, var utbytte i fullblod relativ høyere enn i serum i en studie med VAMS [73]. Holdbarhet for stoffene i VAMS kan være en årsak for at konsentrasjon til stoffene minket over tid. Tiden fra innsamling til analyse var omtrent to dager, og det var fire uker mellom analyse av første VAMS og tredje VAMS. Stabilitet til ulike stoffer i VAMS varierer fra en dag til noen måneder ved romtemperatur og stabiliteten øker ved lavere temperatur [9]. Variasjonen kan også forklares med at VAMS-prøvene ble analysert på forskjellig tidspunkt og analyseinstrumenter hadde ulik følsomhetsgrad for stoffene i ulike dager og evt. avvik i standardtillaging. Det bør gjøres flere undersøkelser av holdbarheten av psykofarmaka samlet med VAMS for å kunne vurdere om det er egnet for TDM.





Figur 24: Sammenligning av resultater mellom VAMS analysert initielt, etter en uke og etter fire uker

5 Konklusjon

I denne oppgaven ble mikroekstraksjonsteknikken PALME kombinert med VAMS som prøvetakingsmetode for terapeutisk legemiddelmonitorering av et utvalgt av psykofarmaka. Stoffene ble ekstrahert fra vandige prøveløsninger, fullblod og VAMS. Målet var å komme fram til en effektiv ekstraksjonsmetode for kvantitativ analyse av de utvalgte psykofarmaka ved optimalisering av ulike ekstraksjonsparametere. Etter ekstraksjon ble ekstraktene analysert med UHPLC-MS/MS. Det ble utført en validering for den optimaliserte ekstraksjonsmetoden. Til slutt ble analytter fra 20 reelle VAMS-prøver ekstrahert og analysert for å undersøke om metoden er egnet til kvantitativ analyse.

Den endelige prosedyren for metoden fra VAMS ble utført ved at VAMS absorberte et nøyaktig volum av fullblodprøve (20 μ l) og ble tørket i minst tre timer. Deretter ble internstandard tilsatt til tippen av VAMS og VAMS ble igjen tørket i minst tre nye timer. Tørket VAMS ble overført til donorbrønningen. Den totale volumet i donorbrønningen var 225 μ l. Donorløsningen bestod av 200 μ l 0,1 M karbonat-bikarbonatbuffer og 25 μ l DMSO. Organisk væskemembran besto av 3 μ l 10 % TOA i DDA og akseptorløsning var 50 μ l 20 mM maursyre. Ekstraksjonstiden var 60 minutter og ristehastighet på 900 rpm fremmet ekstraksjonen av stoffene.

Den optimale metoden ble validert. Ekstraksjonsmetoden viste god spesifisitet når utvalgte psykofarmaka analyseres sammen med andre legemidler og rusmidler. Overdragstesten oppfylte kravet. Standardkurvene hadde R^2 -verdier mellom 0,97-0,99, hvor noen standardkurver hadde kvadratisk tilpasning. Deteksjonsgrensen ble satt mellom 0,25 og 10 ng/ml. Minste kvantifiserbare konsentrasjon var mellom 12 og 300 ng/ml som var innenfor referansesområdet for de fleste stoffene, bortsett fra escitalopram. Dette kan føre til upresise analyseresultater ved kvantitative bestemmelse i det lave området. Testen for hematokrit-effekt viste at det var variasjon i utbytte og matrikseffekt mellom ulike hematokrit-nivåer. Metoden hadde god presisjon, men noe dårligere nøyaktighet. Ekstraksjonsutbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt var ansett som akseptable ved lavt konsentrasjonsnivå. Resultatene for de reelle prøvene viste god overensstemmelse i hvilke stoffer som ble funnet, men avvik i målt konsentrasjon, særlig for ecitalopram og metabolitten. Det ble målt lavere konsentrasjoner i VAMS-prøver fra samme pasient som ble analyserte en og fire uker etter første analyse. Det bør undersøkes nærmere om dette skyldes problemer med holdbarhet eller at det stadig ble mer serum i VAMS-prøvene.

Kombinasjonen av PALME og VAMS forenklet arbeidstrinnene ved at VAMS kan overføres rett til donorbrønn slik at frigjøring av analytt fra VAMS og ekstraksjon av analytt gjennom væske membranen utføres i ett enkelt steg. Kombinasjonen viste noen lovende resultater for ekstraksjon av psykofarmaka og den optimale metoden gir et godt grunnlag for effektive prøveopparbeidelsesmetoder i videre arbeid. Resultater fra metodevalidering og analyse av reelle prøver har vist at mer arbeide må gjøres for at metoden potensielt kan anvendes i et rutine laboratorium. Det er fortsatt mange ekstraksjonsparametere i PALME systemet som bør optimaliseres for å tilpasse flere psykofarmaka og for å kunne bruke systemet til TDM av psykofarmaka.

Litteraturliste

1. U. Malt. *Psykofarmaka*. 2019 [Sitert 01.03.2020]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/psykofarmaka>.
2. A. Mykletun, A.K. Knudsen, and K.S. Mathiesen, *Psykiske lidelser i Norge: Et folkehelseperspektiv*. 2016, Nasjonal folkehelseinstitutt
3. PsykNytt. *Bruker stadig mer psykofarmaka (British Journal of Psychiatry)*. 2012 [Sitert 01.03.2020]; Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/psykisk-helse/aktuelt/bruker-stadig-mer-psykofarmaka-british-journal-of-psychiatry>.
4. R. Kogstad, *Økende bruk av psykofarmaka i Norge*, in *Mad in Norway*. 2019.
5. C. Hiemke, et al., *AGNP Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Psychiatry: Update 2011*. 2011: Pharmacopsychiatry. s. 195-235.
6. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Bioanalyse av legemidler*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 452-486.
7. G. Nys, et al., *Beyond dried blood spot: Current microsampling techniques in the context of biomedical applications*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2017. **97**: s. 326-332.
8. R. Guthrie and A. Susi, *A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS*. Pediatrics, 1963. **32**: s. 338-343.
9. Miranda G. M. Kok and M. Fillet, *Volumetric absorptive microsampling: Current advances and applications*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018. **147**: s. 288-296.
10. S. Velghe, R. De Troyer, and C. Stove, *Dried blood spots in therapeutic drug monitoring and toxicology*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 2018. **14**(1): s. 1-3.
11. N. Spooner, et al., *A device for dried blood microsampling in quantitative bioanalysis: overcoming the issues associated blood hematocrit*. Bioanalysis, 2015. **7**(6): s. 653-659.
12. P. Denniff and N. Spooner, *Volumetric Absorptive Microsampling: A Dried Sample Collection Technique for Quantitative Bioanalysis*. Analytical Chemistry, 2014. **86**(16): s. 8489-8495.
13. M. Hendset and M. Hermann, *Hvorfor måle legemiddelmetabolitter?*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2007. **127**: s. 1786-1788.
14. S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, and T.G. Halvorsen, *Sample Preparation*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 73-122.
15. R.E. Majors, *Sample preparation fundamentals for chromatography*. Vol. 2018. 2013, Wilmington, DE: Agilent Technologies.
16. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(14): s. 2650-2656.
17. H. Liu and P.K. Dasgupta, *Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(11): s. 1817-1821.
18. A. Gjelstad, et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format*. Bioanalysis, 2013. **5**(11): s. 1377-1385.

19. U. Malt and P. Aslaksen. *psykiske lidelser*. 2019 [Sitert 24.03.2020]; Tilgjengelig fra: https://sml.snl.no/psykiske_lidelser.
20. U. Malt. *Psykose*. 09.10.2019 [Sitert 02.04.2020]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/psykose>.
21. Helsedirektoratet. *Utredning, behandling og oppfølging av personer med psykoselidelser*. 06.2013 [Sitert 02.04.2020]; Tilgjengelig fra: <https://www.helsebiblioteket.no/retningslinjer/psykoselidelser/forord>.
22. M.H. Hovd. *Antipsykotika*. 11.12. 2018 [Sitert 02.04.2020]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/antipsykotika>.
23. Legemiddelhandbok. *L5.2 Antipsykotika*. [Sitert 02.04.2020]; Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L5.2/Legemidler_ved_psykiske_lidelser#Lk-05-psykisk-1193.
24. U. Malt. *depresjon*. 27.11.2018 [Sitert 03.04.2020]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/depresjon>.
25. Legemiddelhandbok. *T5.5 Depresjoner*. [Sitert 03.04.2020]; Tilgjengelig fra: <https://www.legemiddelhandboka.no/T5.5/Depresjoner>.
26. H.P. Rang, et al., *Antidepressant drugs in Rang & Dale's Pharmacology* 2016, Elsevier Philadelphia, PA, USA. s. 570-588.
27. Legemiddelhandbok. *L5.7 Tabeller*. [Sitert 03.04.2020]; Tilgjengelig fra: https://www.legemiddelhandboka.no/L5.7/Legemidler_ved_psykiske_lidelser#Lk-05-psykisk-4695.
28. Legemiddelhandbok. *L5.3.2 Selektive seretonin- og noradrenalinreopptakshemere (SNRI)*. [Sitert 03.04.2020]; Tilgjengelig fra: [https://www.legemiddelhandboka.no/L5.3.2/Selektive_serotonin-og_noradrenalinreopptakshemere_\(SNRI\)](https://www.legemiddelhandboka.no/L5.3.2/Selektive_serotonin-og_noradrenalinreopptakshemere_(SNRI)).
29. Norsk legemiddelhandbok. *G16.1 Terapikontroll (TDM)* [Sitert 25.02.2020]; Tilgjengelig fra: [https://www.legemiddelhandboka.no/G16.1/Terapikontroll_\(TDM\)](https://www.legemiddelhandboka.no/G16.1/Terapikontroll_(TDM)).
30. S.H. Hansen, *Biological Samples: Their Composition and Properties, and Their Collection and Storage*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 23-29.
31. O. Sand, Ø.V. Sjaastad, and E. Haug, *Blodet*, in *Menneskets fysiologi*. 2011, Gyldendal Norsk Forlag AS. s. 340-357.
32. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Introduksjon til prøveoppbevaring og analyse i Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 276-281.
33. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Væske-væske-ekstraksjon (LLE)*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 282-291.
34. V. Sharifi, 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): s. 264-276.
35. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1184**(1): s. 132-142.
36. K. Folde Bårdstu, et al., *Supported liquid membranes in hollow fiber liquid-phase microextraction (LPME) – Practical considerations in the three-phase mode*. *Journal of Separation Science*, 2007. **30**(9): s. 1364-1370.

37. A. Gjelstad and S. Pedersen-Bjergaard, *Perspective: Hollow fibre liquid-phase microextraction - principles, performance, applicability, and future directions*. *Scientia Chromatographica*, 2013. **5**: s. 181-189.
38. K.S. Ask, et al., *Liquid-phase microextraction in 96-well plates - calibration and accurate quantification of pharmaceuticals in human plasma samples*. *Journal of Chromatography A*, 2019. **1602**: s. 117-123.
39. L. Eie, et al., *Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018. **410**: s. 1-12.
40. L. Vårdal, et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood*. *Journal of Chromatography B*, 2017. **1048**: s. 77-84.
41. K.S. Ask, et al., *Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction*. *Analytica Chimica Acta*, 2018. **1009**: s. 56-64.
42. I.O. Mestad, *Bestemmelse av rusmidler i blod basert på Volumetric Absorptive Microsampling, Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction og væskechromatografi-massespektrometri*. 2018, Universitetet i Oslo: Farmasøytisk institutt.
43. K.S. Ask, 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**: s. 229-236.
44. A. Gjelstad, et al., *High-throughput liquid-liquid extraction in 96-well format: Parallel artificial liquid membrane extraction*. *LC GC Europe*, 2017. **30**(1): s. 10-17.
45. K.N. Olsen, et al., *Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring*. *Bioanalysis*, 2018. **10**(6): s. 385-395.
46. M. Roldán-Pijuán, S. Pedersen-Bjergaard, and A. Gjelstad, *Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015. **407**(10): s. 2811-2819.
47. S.H. Hansen and L. Reubsaet, *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS)*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 123-172.
48. S.H. Hansen, *General Chromatographic Theory and Principles*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 31-60.
49. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Apparatur for væskechromatografi (HPLC)*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 173-189.
50. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Massespektrometri*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 246-275.
51. ChemAxon. [Sisert 22.03.2020]; Tilgjengelig fra: <https://chemicalize.com>.
52. Farmakologiportalen. [Sisert 22.03.2020]; Tilgjengelig fra: <http://www.farmakologiportalen.no>.
53. U.S National Library og Medicine. *Pubchem*. [Sisert 22.03.2020]; Tilgjengelig fra: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

54. B. Qoragllu, *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) av monobasiske legemidler og zwitterioner*. 2019, UiT Norges arktiske universitet.
55. B.K. Matuszewski, M.L. Matuszewski, 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): s. 3019-3030.
56. Committee for Medicinal Products for Human Use. *Guideline on bioanalytical method validation*. 2011 [Sisert 19.03.2020]; Tilgjengelig fra: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
57. Sara Capiou, et al., *Official International Association for Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Guideline: Development and Validation of Dried Blood Spot–Based Methods for Therapeutic Drug Monitoring*. Therapeutic Drug Monitoring, 2019. **41**(4): s. 409-430.
58. S.H. Hansen, *Quantitative and Qualitative Chromatographic Analysis*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 61-71.
59. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Kvantitativ analyse*, in *Legemiddelanalyse*. 2004, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 219-231.
60. I. Marchi, et al., *Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(25): s. 4071-4078.
61. E. Stokvis, H. Rosing, and J.H. Beijnen, *Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?* Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2005. **19**(3): s. 401-407.
62. P. Abu-Rabie, et al., *Investigation of Different Approaches to Incorporating Internal Standard in DBS Quantitative Bioanalytical Workflows and Their Effect on Nullifying Hematocrit-Based Assay Bias*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(9): s. 4996-5003.
63. H.k.H. Nestande, *Parallell ekstraksjon av basiske legemidler over kunstige væskemembraner*, in *Farmasøytisk institutt*. 2018, Universitetet i Oslo.
64. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Grunnleggende teori*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 37-66.
65. Scientific Working Group for Forensic Toxicology, *Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*. Journal of Analytical Toxicology, 2013. **37**(7): s. 452-474.
66. L. Vårdal, *Parallel artificial liquid membrane extraction (PALME) til analyse av nye psykoaktive stoffer i blod*, in *Det matematisk-naturvitenskapelige* 2014, Universitetet i Oslo: Farmasøytisk institutt. .
67. F.T. Peters, O.H. Drummer, and F. Musshoff, *Validation of new methods*. Forensic Science International, 2007. **165**(2): s. 216-224.
68. Diakonhjemmetsykehus. *legemiddelanalyser*. [Sisert 29.03.2020]; Tilgjengelig fra: <https://diakonhjemmetsykehus.no/senter-for-psykofarmakologi-sfp/legemiddelanalyser>
69. M. Jørgensen and M.A. Kall, *Regulated Bioanalysis and Guidelines*, in *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques, and Mass Spectrometry*, S.H. Hansen and S. Pedersen-Bjergaard, Editors. 2015, John Wiley & Sons Ltd: United Kingdom. s. 283-303.
70. S. Pedersen-Bjergaard and K.E. Rasmussen, *Kvalitetsstandarder*, in *Legemiddelanalyse*. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 488-500.

71. P. Panuwet, et al., *Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring*. Critical reviews in analytical chemistry, 2016. **46**(2): s. 93-105.
72. D. Montenarh, et al., *Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS—comparative validation in whole blood, plasma, and serum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(24): s. 5939-5953.
73. L. MERCOLINI¹, et al. *THERAPEUTIC DRUG MONITORING (TDM) BY MEANS OF NOVEL SAMPLING AND EXTRACTION PROCEDURES: A COMPARATIVE STUDY*. [Siteret 29.04.2020]; Tilgjengelig fra:
https://cdn2.hubspot.net/hubfs/1806452/Content/RND_Posters/TDM%20of%20Atypical%20Antipsychotics%20-%20Comparative%20Study%20of%20Sample%20Collection%20Methods%20-%20Plasma%20vs%20Capillary%20Blood%20-%20A%20COMPARATIVE%20STUDY-1.pdf

Vedlegg

Vedlegg 1: Referanseområder for analyttene

Analytt	Referanseområder (ng/ml)[68]
Venlafaksin	100-500
Escitalopram	6-40
Kvetiapin	20-300
Aripiprazol	90-600
Amitriptylin	80-210
Nortriptylin	50-160
Klorprotiksen	3-30

Vedlegg 2: Utbytte, prosesseffektivitet og matrikseffekt for analytter med konsentrasjon 50 og 500 ng/ml i prøveløsning med IS korrigerings

Analytt	50 ng/ml		
	Utbytte(RSD)	PE (RSD)	Matrikseffekt(RSD)
O-desmetylvenlafaksin	38%(31%)	52%(14%)	144%(25%)
Venlafaksin	76% (15%)	104%(8%)	138%(20%)
Escitalopram	79%(15%)	93%(12%)	120%(21%)
Kvetiapin	79%(19%)	530%(5%)	683%(15%)
Aripiprazol	85%(10%)	84%(5%)	114%(17%)
Amitriptylin	55%(34%)	79%(8%)	155%(33%)
Notriptylin	69%(30%)	99%(4%)	152%(29%)
Kloprotiksen	62%(13%)	71%(18%)	113%(10%)
Analytt	500 ng/ml		
	Utbytte(RSD)	PE (RSD)	Matrikseffekt(RSD)
O-desmetylvenlafaksin	66%(9%)	76%(20)	116%(22%)
Venlafaksin	96%(6%)	116%(21%)	120%(17%)

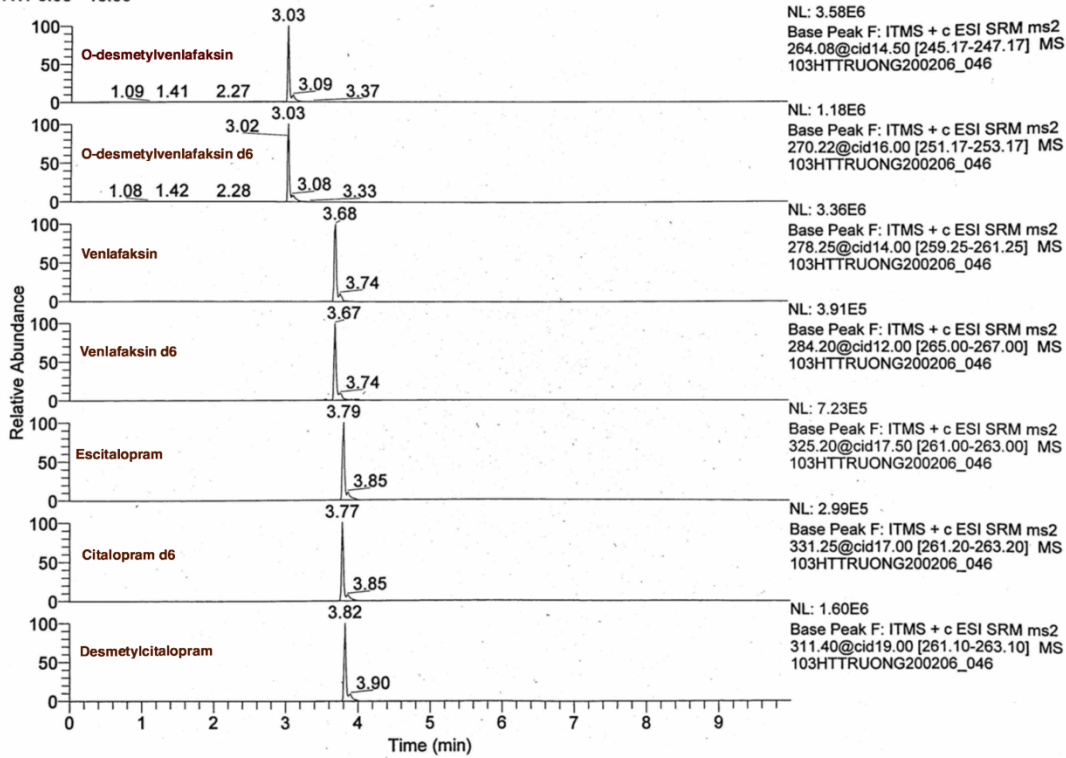
Escitalopram	93%(8%)	104%(18%)	113%(19%)
Kvetiapin	101%(11%)	148%(15%)	149%(21%)
Aripiprazol	91%(6%)	75%(15%)	83%(18%)
Amitriptylin	82%(15%)	95%(20%)	118%(21%)
Notriptylin	95%(8%)	107%(18%)	113%(21%)
Kloprotiksen	75%(16%)	74%(20%)	100%(20%)

Vedlegg 3 Kromatogrammer

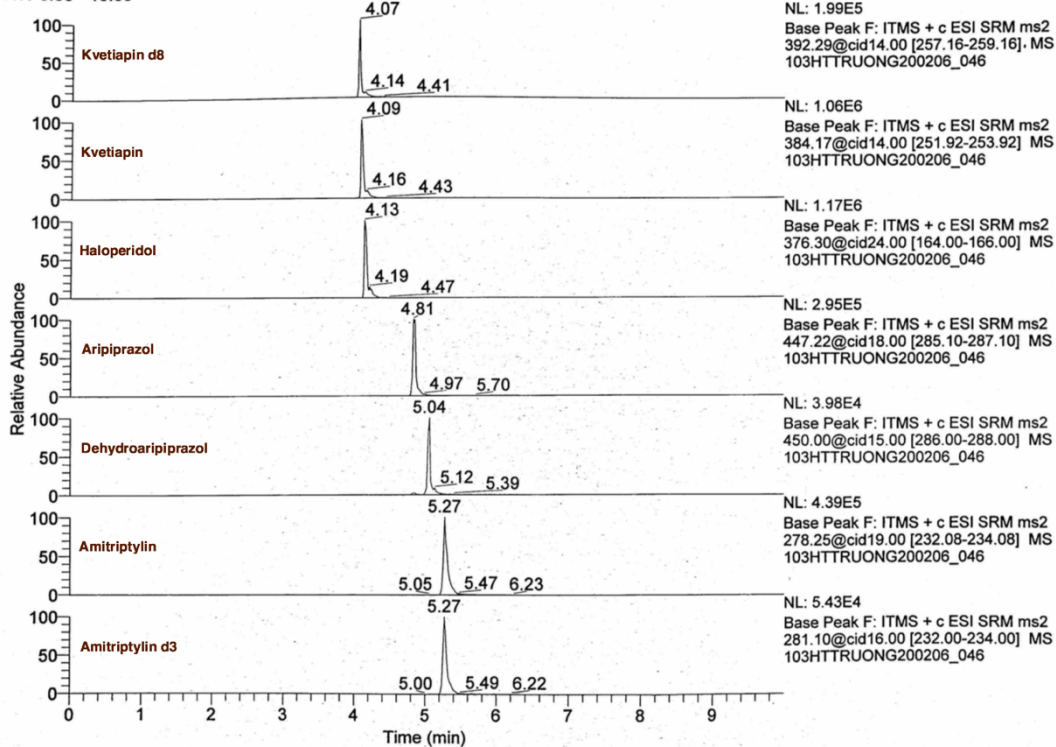
C:\Xcalibur\...103HTTRUONG200206_046

08-Feb-20 4:09:31 AM

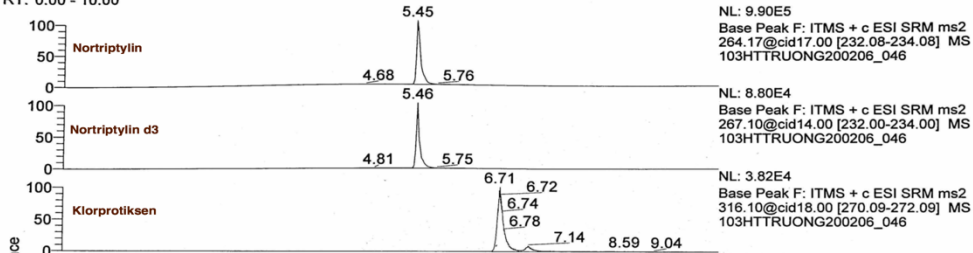
RT: 0.00 - 10.00



RT: 0.00 - 10.00



RT: 0.00 - 10.00



*Ved sammenskriving ble det funnet ut at kromatogram til n-desalkylkvetiapin var manglet. Det var ikke mulighet å innhenting kromatogrammet til stoffet siden FI bygningen var stengt i forbindelse med koronaviruset. Kromatogrammet til n-desalkylkvetiapin ble der for ikke inkludert i oppgaven.

Vedlegg 4 Konsentrasjon av stoffene som ble inkludert i spesifisitetstesten

Forbindelse	Konsentrasjon i blod (µM)	Forbindelse	Konsentrasjon i blod (µM)
Buprenofin	0,10	Fenazepam	0,33
LSD	0,03	Midazolam	10,00
Metylfenidat	1,00	Flunitrazepam	0,33
Fentanyl	0,10	Bromazepam	3,33
Metadon	3,33	Lorazepam	3,33
Tramadol	10,00	Klobazam	2,00
Zolpidem	3,33	Etizolam	6,67
Ketamin	10,00	Triazolam	0,20
Oksykodon	3,33	Pyrazolam	2,00
Kokain	1,67	Zopiklon	1,67
Salicylsyre (1007 STD1)	14,0	Salicylsyre (1007 STD2)	70
Fenytoin (1007 STD1)	4,2	Fenytoin (1007 STD2)	21
Ibuprofen (1007 STD1)	9,8	Ibuprofen (1007 STD2)	49
Fenobarbital (1007 STD1)	7,0	Fenobarbital (1007 STD2)	35
Pentobarbital (1007 STD1)	0,6	Pentobarbital (1007 STD2)	2,80
Tiopental (1007 STD1)	5,6	Tiopental (1007 STD2)	28
THC	0,02	N-desmetyldiazepam	1,00
Amfetamin	2,00	Oksazepam	1,50
Metamfetamin	2,00	Alprazolam	0,24
MDMA	2,00	Nitrazepam	0,24
Klonazepam	0,16	Morfin	0,40
Diazepam	1,00	Kodein	0,40

Vedlegg 5: Poster fra Kromatografisymposiet konferanse i 2020, Sandefjord



MINIATYRISERING AV TERAPEUTISK LEGEMIDDEL-MONITORERING

My Truong, Marthe Lid, Astrid Gjelstad, Elisabeth Leere Øiestad

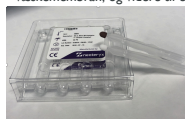
Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo

BAKGRUNN

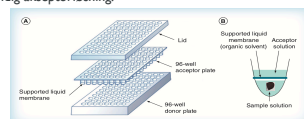
- Det er stor grad av farmakokinetisk variabilitet for psykofarmaka. Legemiddelgruppen omfatter både antipsykotika og antidepressiva. Terapeutisk legemiddelmonitorering (TDM) av psykofarmaka er nyttig for å optimalisere behandling av hver enkelt pasient.
- Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS) er den nyere mikrosamplingsmetoden for prøvetaking av biologiske prøver. Teknikken tillater oppsamling av et nøyaktig volum av biologiske prøver i en liten "provesvamp". Ved bruk av VAMS unngår man ulempe knyttet til de tradisjonelle samplingsmetodene. Teknikken er enkel å utføre og dermed kan pasienter selv ta prøve hjemme og sender VAMSene til laboratoriet ved posten.
- På grunn av økende bruk av psykofarmaka er det ønskelig en effektiv metode for analyse av psykofarmaka i blod. Med ekstraksjonsmetode Parallell Artificial Membrane Extraction (PALME) kan VAMSene puttes rett inn i en 96-brønnsplater og ekstrahere. Ekstrakter kan deretter injiseres direkte i LC-MS instrumentet.

METODE

- Fersk full blod er først spiket med arbeidsløsning tilsatt analytter. VAMS dyppes i spiket blod. VAMSene skal tørkes i minst 3 timer. VAMSene skal tørkes før de kan putte rett inn i donorbrønner.
- Palme-opsett vises i figur 2. Den 96-brønns format utgjør et trefase system hvor analytten ekstraheres fra vandig prøve i en donorbrønn, over en organisk væskemembran, og videre til en vandig akseptorløsning.



Figur 1. Volumetric Absorptive Microsampling (VAMS)



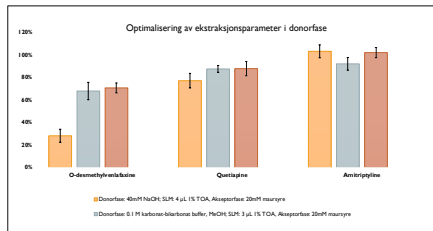
Figur 2. PALME oppsett. A: Oppsettet består av en 96-brønnsplater og en 96-brønns filtriplate korresponderende i brønnsplaten, og et bakk for å blande forstørrelse. B: Ekstraksjonsoppsettet i hver enkelt brønn, der VAMS puttes rett inn i brønnen.

HENSIKT

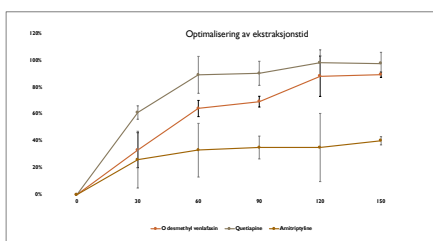
Hensikten med prosjektet er å utvikle en metode for «miniatyrisert TDM» for psykofarmaka

FORELØPIGE RESULTATER

Optimalisering ekstraksjonsparametere



Figur 3. Prosesseffektivitet ved forskjellige ekstraksjonsparametere i donorfase. Alle betingelsene har 20 mM msaursyre i akseptorfase. Det er ulike buffertypene og ulike konsentrasjon av trioktylammin i dodecylacetat i organisk væskemembran mellom betingelsene. Betingelsen der det er brukt karbonat-bikarbonat buffer, og 10 % TODA ga høyest prosesseffektivitet. Dermed ble betingelsen brukt til videre forsøk.



Figur 4. Tidskurve for ekstraksjon av analytt i VAMS. Prosesseffektivitet er høyest rundt 60-90 minutter for de fleste analytter, unntatt O-desmetylvenlafaxin. Kurvene flater ut etter 90 min. Optimal ekstraksjonstid ligger mellom 60-90 minutter.

Optimalisering av tilsetning av interstandard til VAMS

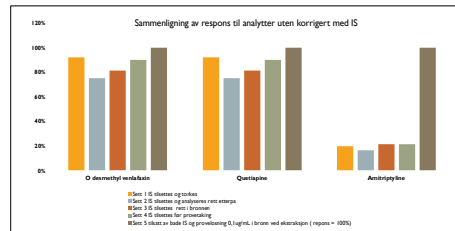


Figure 5: Sammenligning av respons til analytter uten korrigeret med IS. Resultater viser at det ikke er signifikant forskjell i responsen når prøve sitter i VAMSen eller når prøver legges direkte i akseptorbrønn, unntatt Amitriptyline. Dette kan skyldes at Amitriptyline har høyere proteinbinding og er mer upolar enn de andre analyttenes.

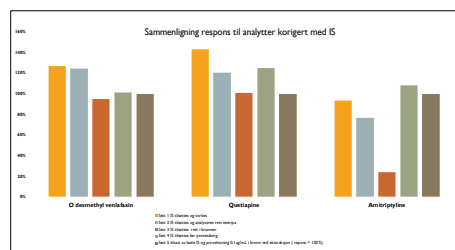


Figure 6: Sammenligning av respons til analytter korrigeret med IS. Tilsatt av interstandard direkte på VAMS er sammenliknet med tilsatt i prøvebrønnene, noe som viste at interstandard bør tilsettes VAMSen for analysen.

KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Bruk av karbonat-bikarbonatbuffer i donorbrønnen og 10 % tritoktylammin i dodecyl acetat (v/v) som organisk membran og en riste hastighet på 900 rpm i 60-90 minutter gir optimal prosesseffektivitet.

Interstandard bør tilsettes VAMSen for analyse.

Videre arbeide er å validere metoden og analysere autentiske prøver i samarbeid med Diakonhjemmet sykehus.

Referanse

1. Norsk legemiddel handbok. Terapikontroll(TDM). Oslo:Legemiddelhandboka [Internett]; 2019 [Hentet 13.12.2019]. URL: http://www.legemiddelhandboka.no/16.1.1_Terapikontroll_TDM
2. Ingrid, M., (2018). Bestemmelse av rusmidler i blod basert på Volumetric Absorptive Microsampling, Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction og væskrokromatografi-massepektrometri. [Mastoppgaven ved farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo]
3. Gjelstad, A., Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid extraction in the 96-well format. Bioanalysis, 2013, 5(11): p. 1377-1385.