

# Elektromembranekstraksjon av THC- syre

Kimmi Thoa Vo



Masteroppgave i legemiddelanalyse  
Master i farmasi  
45 studiepoeng

Farmasøytisk institutt  
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO  
Mai 2020



# Elektromembranekstraksjon av THC-syre

Masteroppgaven ble gjennomført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Seksjon for farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk institutt på Universitet i Oslo i perioden august 2019 til mai 2020.

**Kimmi Thoa Vo**

Masteroppgave ved Faggruppen for Legemiddelanalyse,

Seksjon for farmasøytisk kjemi,

Farmasøytisk institutt, Universitet i Oslo

I perioden august 2019 til mai 2020

## **Veiledere:**

Førsteamanuensis Elisabeth Leere Øiestad

Avdelingsingeniør Marthe Lid

© Kimmi Thoa Vo

2020

**Elektromembranekstraksjon av THC-syre**

Kimmi Thoa Vo

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

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Sammendrag

Elektromembranekstraksjon (EME) har siden den første publiserte artikkelen i 2006, vist seg å være en effektiv prøveopparbeidelsesmetode til ekstraksjon av blant annet sure og basiske legemidler, hvor det foreligger flest studier av det sistnevnte. For å forenkle gjennomføring av EME er det blitt utviklet 96-brønnsplate i stål. Dette muliggjør ekstraksjon av flere prøver samtidig og kan i teorien ekstrahere opptil 96 brønner ved en enkelt ekstraksjon, hvilket er tidsbesparende og letter mye av arbeidet. For å videre øke interessen av EME er det tiltenkt å kommersialisere utstyr som kan forenkle mye av arbeidet som gjøres rutinemessig ved rutinelaboratorier, som dermed åpner opp for et nytt og attraktivt applikasjonsområde.

I denne oppgaven ble EME for første gang anvendt til prøveopparbeidelse av THC-syre fra urin. Innledningsvis ble 96-brønnsplate benyttet for ekstraksjon av THC-syre fra vandige prøver. Ulike organiske løsemidler ble undersøkt med hensikt på dannelsen av egnet organisk væskemembran (*supported liquid membrane, SLM*). Alkoholene oktanol, nonanol og undekanol ble undersøkt, samt dodecylacetat og 2-nitrofenyloktyleter (NPOE). Videre ble modifisering av akseptorløsning undersøkt for å gjøre den mer upolar og dermed øke løseligheten av THC-syre, som er en relativ upolar syre. Det ble forsøkt å tilsette ulike mengder av dimetylsulfoksid (DMSO) på henholdsvis 25, 40, 50, 60, 70, 75 og 80 % i 50 mM ammoniumacetat (v/v). Til slutt ble ulike basiske buffere undersøkt som fortynningsløsning for prøveløsning, da det er essensielt for THC-syre å være ionisert (50 mM ammoniumacetat, 50 mM ammoniumformat, 50 mM NaOH og 1 M NaOH, samt ulike løsninger av 1 M NaOH). Ekstraktene ble analysert på *Ultrahigh performance liquid chromatography* med tandem MS (UHPLC-MS/MS).

Optimalisering av disse betingelsene ga følgende resultater: Da THC-syre er en relativ upolar syre med log P 5,14, ble det oppnådd stort sett gode resultater med en kombinasjon av langkjedede alkoholer; SLM med nonanol:undekanol 25:75 (v/v) ble vurdert som mest egnet for ekstraksjon. Det ble også observert økt prosesseffektivitet ved å benytte 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat som akseptorløsning. 50 mM ammoniumacetat ble benyttet som fortynningsløsning. Dette dannet grunnlaget for ekstraksjonsbetingelser benyttet med et kommersielt utstyr som er under utvikling av Extraction Technology Norway AS.

Analyser av urin ble utført med kommersielt utstyr. Innledningsvis ble akseptorvolum på henholdsvis 800, 600 og 400 µl undersøkt ettersom det var ønskelig å oppnå oppkonsentrering

med dette systemet. Det laveste akseptorvolumet som kunne benyttes var 400 µl og ga et relativt stabilt system med tanke på strøm. Ekstraksjonsparametere ved bruk av kommersielt utstyr for EME ble optimalisert ved å benytte en tilnærming av forsøksdesign med hensikt på ekstraksjonsutbytte og oppkonsentrering. Dette ble utført med et faktorforsøk hvor overflate-respons modell (*response surface model*, RSM) ble benyttet som forsøksoppsett. Fire ekstraksjonsparametere ble undersøkt: ekstraksjonstid, donorvolum, akseptorvolum og risting. Basert på modellen kan høyt ekstraksjonsutbytte oppnås ved maksimal ekstraksjonstid (30 minutter) og risting (1800 rpm) når det benyttes lavt donorvolum. For oppnåelse av høy oppkonsentrering bør det benyttes lavt akseptorvolum og høyt donorvolum, hvilket gir en stor forskjell i volumforhold. Videre ble sterk base (10 M natriumhydroksid (NaOH)) tilsatt i donorløsning bestående av prøve og urin for å utføre basehydrolyse, hvor disse prøvene ble satt i varmeskap. Effekten av nøytralisering av prøvene med 10 M saltsyre (HCl) ble undersøkt, hvor betingelse 1 med 100 µl MilliQ-vann og 500 µl 100 mM ammoniumacetat ble videre brukt i evaluering av metoden. Analysen ble utført på UHPLC-MS/MS.

Metodeevalueringen innebar evaluering av linearitet, presisjon og nøyaktighet, minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet, matrikseffekter og holdbarhet. Standardkurven  $r^2$ -verdi var 0,99. Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet ble beregnet å være omtrent 2 %. MKK ble grovt satt til 10 ng/ml. Evalueringen for øvrig viste stort sett tilfredsstillende resultat for presisjon og nøyaktighet, samt matrikseffekter. Test av holdbarhet viste at ekstraktene var holdbare i opptil fire dager ved 10 °C.

Resultatene oppnådd i denne oppgaven viste at EME med kommersielt utstyr kunne benyttes til ekstraksjon av THC-syre fra urin. Metoden ser ut til å kunne benyttes til kvantifisering, og videre optimalisering av ekstraksjonsbetingelser kan tenkes å bedre ekstraksjonen av THC-syre. Det var planlagt å utføre ekstraksjoner av hårprøver, men dette utgikk da covid-19 medførte stenging av Universitetet i Oslo og eksternt arbeid ved OUS.

# Forord

I forbindelse med denne oppgaven vil jeg rette en stor takk til mine veiledere for meget god veiledning, oppfølging og støtte gjennom hele masteroppgaven. **Elisabeth Leere Øiestad**, som alltid er blid og inspirerende. Takk for din engasjerende personlighet som har motivert meg i arbeidet, og for all den gode hjelpen jeg har fått av deg på lab, oppgaveskriving og gode samtaler (både faglige og ikke faglige). Du var alltid tilgjengelig, uansett hva det enn måtte være. Det har vært koselig å jobbe med deg, og jeg er veldig glad for at jeg fikk deg som min hovedveileder. **Marthe Lid**, som alltid er imøtekommende og vennlig. Det var trist da du sluttet ved Farmasøytisk institutt, men jeg er takknemlig for den tiden du veiledet meg. Takk for at du alltid tok deg tid til å hjelpe meg og mine mange spørsmål – alt fra analyseinstrumentet til beregninger av enkle matematiske regnestykker.

Jeg vil også takke **Stig Pedersen-Bjergaard** og **Frederik Hansen** for deres kloke og kreative tanker og råd som var til stor hjelp. Takk for at dere kom med mange gode innspill, i tillegg til å hjelpe meg en del på lab. Takk til Frederik som tok seg tid på å forklare mye av de matematiske og statistiske modellene, samt de gode tilbakemeldinger jeg har fått fra deg.

Tusen takk til dere alle på legemiddelanalyse; takk for at jeg kunne være en del av det sosiale og læringsrike miljøet. Dere er en gøyale gjeng.

Videre vil jeg takke mine studievenninner My og Kim Tu, samt medstudentene Thong, Milena, Jasna og Fadi som jeg har delt masterkontor med. Uten dere hadde ikke det siste året på farmasi vært så minnerikt og gøy. Takk for god stemning, hjelp og trøst på masterkontoret. Dere er fantastiske.

Til slutt vil jeg takke **familien** min, som har støttet og motivert meg gjennom hele masterstudiet og som alltid har vært tilstede når jeg har trengt dem. Jeg er utrolig heldig som har dere i livet mitt!

Oslo, Mai 2020

-----

Kimmi Thoa Vo

# Innholdsfortegnelse

Forkortelser .....	1
1 Innledning.....	4
1.1 Bakgrunn .....	4
1.2 Hensikt.....	6
2 Teori .....	8
2.1 Cannabis .....	8
2.1.1 Bruk av cannabis .....	9
2.2 THC-syre .....	9
2.2.1 THC-syre i biologiske prøver.....	10
2.3 Prøveopparbeidelse.....	11
2.4 Elektromembranekstraksjon (EME).....	11
2.4.1 Ekstraksjonsspenning og –tid.....	12
2.4.2 Organisk væskemembran (SLM).....	13
2.4.3 pH.....	14
2.4.4 Grad av risting.....	15
2.4.5 Ulike formater for EME .....	15
2.5 Væskekromatografi (LC).....	16
2.5.1 Omvendt-fase-kromatografi .....	16
2.5.2 <i>Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)</i> .....	17
2.6 Massespektrometri (MS) .....	18
2.6.1 Elektrosprayionisering (ESI).....	19
2.6.2 Lineær ionefelle.....	20
2.6.3 Trippel kvadrupol (QqQ) .....	21
2.7 Statistisk forsøksdesign .....	22
3 Material og metode.....	26
3.1 Analyttkarakteristikk .....	26
3.2 Kjemikalier .....	27
3.3 Utstyr .....	28
3.4 Løsninger.....	31
3.4.1 Buffere.....	31
3.4.2 Diverse løsninger.....	32



3.4.3	Stamløsninger .....	32
3.4.4	Arbeidsløsninger .....	32
3.4.5	Standarder og kontroller .....	33
3.4.6	Prøveløsninger .....	34
3.4.7	Internstandard .....	34
3.4.8	Mobilfaser .....	34
3.5	Instrumentelle betingelser .....	35
3.5.1	LC-ITMS .....	35
3.5.2	LC-QqQ .....	37
3.6	Oppsett av EME-systemet .....	39
3.6.1	EME-system med 96-brønnersformat .....	39
3.6.2	EME-system med kommersielt utstyr .....	41
3.7	Utførelse av EME .....	42
3.7.1	Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger .....	42
3.7.2	Ekstraksjon fra biologisk prøve .....	47
3.8	Forsøksoppsett ved optimalisering av 96-brønnersformat .....	49
3.8.1	Akseptorløsning .....	49
3.8.2	Organisk løsemiddel til SLM .....	49
3.8.3	Donorløsning .....	50
3.9	Forsøksoppsett ved optimalisering av kommersielt utstyr .....	51
3.9.1	Akseptorvolum .....	51
3.9.2	Faktorforsøk .....	51
3.9.3	Nøytralisering av donorløsning og mengde ammoniumacetat .....	51
3.10	Evaluering av metoden .....	52
3.10.1	Linearitet .....	53
3.10.2	Presisjon og nøyaktighet .....	53
3.10.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK) .....	54
3.10.4	Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet .....	54
3.10.5	Matrikseffekter .....	55
3.10.6	Holdbarhet .....	55
4	Resultater og diskusjon .....	56
4.1	Optimalisering av ekstraksjonsparametere med 96-brønnersformat .....	56
4.1.1	Akseptorløsning .....	56

4.1.2	Organisk løsemiddel til SLM .....	59
4.1.3	Donorløsning .....	64
4.1.4	Oppsummering av innledende forsøk med 96-brønnsplate.....	68
4.2	Optimalisering av ekstraksjonsparametere med kommersielt utstyr.....	68
4.2.1	Akseptorvolum .....	69
4.2.2	Faktorforsøk .....	70
4.2.3	Nøytralisering av donorløsning og mengde ammoniumacetat.....	81
4.3	Evaluering av metoden .....	83
4.3.1	Linearitet .....	86
4.3.2	Presisjon og nøyaktighet .....	87
4.3.3	Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK).....	89
4.3.4	Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet .....	90
4.3.5	Matrikseffekter .....	91
4.3.6	Holdbarhet .....	92
5	Avsluttende bemerkninger .....	94
6	Konklusjon .....	97
	Litteraturliste .....	99
	Vedlegg .....	103

# Forkortelser

μA	Mikroampere
μg	Mikrogram
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
A	Ampere
AU	<i>Arbitrary units</i>
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CCD	<i>Central composite design</i>
CE	<i>Capillary electrophoresis</i> /kapillær elektroforese
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>
Da	Dalton
DAS	<i>Dilute and shoot</i>
DEHP	bis(2-etylheksyl)fosfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DOE	<i>Design of experiments</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> /Det europeiske legemiddelkontor
EME	<i>Electromembrane extraction</i> /elektromembranekstraksjon
ESI	Elektrosprayionisering
eV	Elektronvolt
g	Gram
GC-MS/MS	Gasskromatografi med tandem MS
H	Høydeekvivalent til en teoretisk plate
HCl	Saltsyre
HETP	Høydeekvivalent til en teoretisk plate
HF-LPME	<i>Hollow fiber-LPME</i> /Hullfiber-LPME
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> /væskekromatografi
KOH	Kaliumhydroksid
kV	Kilovolt
LC	<i>Liquid chromatography</i> /væskekromatografi

LC-ITMS	Væskekromatografi koblet med lineær ionefelle
LC-MS/MS	Væskekromatografi koblet med tandem massespektrometri
LC-QqQ	Væskekromatografi koblet med trippel kvadrupol
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> /væske-væske-ekstraksjon
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>
LPME	<i>Liquid-phase microextraction</i> /væske-fase-mikroekstraksjon
M	Molar
m/z	Masse-til-ladningsforhold
ME	Matrikseffekt
mg	Milligram
MKK	Minste kvantifiserbare konsentrasjon
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Massespektrometer
MS/MS	Tandem massespektrometri
N <sub>2</sub>	Nitrogengass
NaOH	Natriumhydroksid
NPOE	2-nitrofenyloktyleter
NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drugs</i> /Ikke-steroide anti-inflammatoriske midler
OFAT	<i>One-factor-at-a-time</i>
OUS	Oslo Universitetssykehus
Pa-EME	Parallell-EME
PALME	<i>Parallel artificial liquid membrane extraction</i>
PE	<i>Processes efficiency</i> /prosesseffektivitet
PP	Polypropylen
PPT	<i>Protein precipitation</i> /proteinfelling
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QqQ	Trippelkvadrupol
R <sup>2</sup>	<i>R squared</i> , bestemmelseskoefisient

RF	Radiofrekvent spenning
rpm	<i>Revolutions per minute</i> /omdreininger per minutt
RSD	Relativt Standardavvik
RSM	<i>Response surface model</i> /respons-overflatemodell
S/N-forhold	Signal-til-støy-forhold
SD	Standardavvik
SLE	<i>Supported liquid extraction</i> /supported væske-ekstraksjon
SLM	<i>Supported liquid membrane</i> /organisk væskemembran
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> /fast-fase-ekstraksjon
SPME	<i>Solid-phase microextraction</i> /fast-fase-mikroekstraksjon
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SWGTOX	<i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i>
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
THC-syre	11-nor-karboksy-delta-9-THC
UHPLC	<i>Ultrahigh performance liquid chromatography</i>
V	Volt

# 1 Innledning

## 1.1 Bakgrunn

Analyse av biologiske prøver som blant annet blod, urin, hår og spytt utføres rutinemessig innenfor ulike områder. Det utføres analyser av biologiske prøver innenfor retts toksikologi, terapeutisk legemiddelmonitorering (terapi kontroll), doping- og rusmiddelkontroll [1]. Analyse av biologiske medier kan imidlertid by på en del utfordringer. Biologiske prøver har en kompleks sammensetning av matrikskomponenter som proteiner, peptider, fosfolipider, celler og andre bestanddeler. Disse endogene substansene kan forårsake bakgrunnsstøy, matrikseffekter ved å interferere med respons av analytt og eventuelt skade analyseinstrumentet [1]. I tillegg kan analytt foreligge i lave konsentrasjoner i prøvene og kan dermed være vanskelig å detektere. Det er derfor ofte nødvendig å utføre prøveoppbehandling av biologiske prøver før de analyseres på analyseinstrument. Gjennom prøveoppbehandling oppnår man prøver som er kompatible med analyseinstrumentet ved å fjerne matrikskomponenter, samt oppkonsentrering av analytt slik at den foreligger i en konsentrasjon som kan detekteres.

Væskerkromatografi kombinert med tandem massespektrometri (LC-MS/MS) har i flere år blitt anvendt til analyse av moderne biologiske prøver da man oppnår høy selektivitet og sensitivitet. Prøveoppbehandling er derfor nødvendig, ettersom LC-MS/MS er spesielt utsatt for matrikseffekter som kan påvirke den kvantitative bestemmelsen av analytt [2].

Det finnes ulike prøveoppbehandlingsmetoder. De mest anvendte prøveoppbehandlingsmetoder i moderne bioanalyse er proteinfelling (*protein precipitation*, PPT), fast-fase-ekstraksjon (*solid-phase extraction*, SPE), væske-væske ekstraksjon (*liquid-liquid extraction*, LLE) og til dels *dilute and shoot* (DAS) [1-3]. PPT er en rask og enkel metode som benyttes til å fjerne proteiner i serum og plasma, men har som ulempe begrenset opprensning av prøven, hvilket gjør at PPT er ikke en selektiv metode. Analytter kan også felles ut med proteinene. Prøven inneholder fremdeles andre matrikskomponenter som fosfolipider, som kan medføre matrikseffekter i form av ioneundertrykkelse i LC-MS [3]. LLE er enkel og rimelig å utføre, samt lett å standardisere. Da analytter fra et biologisk medium overføres til et organisk løsemiddel, forblir de fleste matrikskomponentene i det biologiske mediet. Denne metoden kan gi høyt utbytte og rene prøver, men benytter en del organiske løsemidler. I tillegg er det vanskelig å automatisere LLE. SPE er en veldig effektiv metode som gir høyt ekstraksjonsutbytte, men det krever kostbart

utstyr samt mye organisk løsemiddel. DAS er en enkel metode som benytter fortykning av prøver og brukes nesten utelukkende på urinprøver. Denne metoden begrenses ofte til analyse da det benyttes i hovedsak for prøver med høy analyttkonsentrasjon, samt lite opprensning som gir urene prøver [3].

For å overkomme noen av ulempene ved de tradisjonelle prøveopparbeidelsesmetodene, har det blitt utviklet nye metoder basert på miniatyrisering av LLE og SPE, såkalt fast-fase mikroekstraksjon (*solid-phase microextraction*, SPME) og væske-fase-mikroekstraksjon (*liquid-phase microextraction*, LPME) [4, 5]. Bruken av disse mikroekstraksjonene reduserer mengden av organisk løsemiddel betydelig. Opprensning og oppkonsentrering er vesentlig bedre, og det oppnås vanligvis store ekstraksjonsutbytter. Andre fordeler med disse metodene er at de kan anvendes på små mengder biologisk prøve og kan lettere automatisere prøveopparbeidelsen [6].

Det har blitt utviklet en rekke forskjellige varianter av LPME. I de nye variantene av LPME blir analytter fra en vandig prøve, også kjent som donorfase, ekstrahert gjennom en væske-membran bestående av organisk løsemiddel immobilisert i porene i veggen til en porøs hull-fibermembran (*supported liquid membrane*, SLM), og over til en ny løsning kalt akseptor-løsning eller akseptorfase [7, 8]. LPME kan utføres i to ulike systemer, et to-fase eller et tre-fase system. I to-fase LPME består akseptorfase av det samme organiske løsemidlet som brukes som SLM, mens akseptorfase i tre-fase LPME består av en vandig løsning. En fordel med tre-fase LPME er at ekstraktet kan injiseres direkte i væskrokromatografi (eksempelvis *high performance liquid chromatography*, HPLC) og kapillær elektroforese (*capillary electrophoresis*, CE) [7, 8]. Tre-fase LPME er særlig godt egnet for basiske og sure analytter. For ekstraksjon av basiske og sure analytter, benyttes pH-gradient over væskemembranen som drivkraft ved å justere pH i prøve- og akseptorløsning slik at analyttene er uladet i prøve-løsningen og holder seg ionisert i akseptorløsningen. Analyttene transporteres over væskemembranen ved passiv diffusjon.

Elektromembranekstraksjon (*electromembrane extraction*, EME) ble første gang beskrevet i 2006 av Pedersen-Bjergaard og Rasmussen, og er en videreutvikling av tre-fase LPME [9]. Istedenfor å benytte passiv diffusjon som i LPME, blir det her benyttet elektrokinetisk migrasjon av ioniserbare analytter. Elektrokinetisk migrasjon av analytter oppnås ved å justere pH i både donor- og akseptorløsning slik at analyttene forblir ioniserte, i tillegg til ekstern påføring av spenning i systemet ved bruk av elektroder. Denne ekstraksjonsmetoden gir dermed mulighet for hurtigere ekstraksjoner enn ved bruk av LPME, uten å påvirke fordelene som

effektiv opprensning, oppkonsentrering og isolering av analytter. EME ble innledningsvis benyttet på upolare basiske legemidler i vandige prøver, men har i senere tid blitt benyttet innenfor ulike områder og for nye forbindelser [9]. EME har blant annet blitt brukt til å isolere polare basiske små-molekylære legemidler [10, 11], både upolare og polare sure små-molekylære legemidler [12-14], aminosyrer [15, 16] og peptider [17, 18].

Det foreligger flere studier om EME av basiske analytter sammenlignet med sure analytter. Det eksisterer per i dag ingen studier av EME benyttet til isolering av 11-nor-karboksy-delta-9-THC, også kjent som THC-syre. THC-syre er en metabolitt av delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) som er den viktigste komponenten i cannabis som gir psykotrope effekter. Flere laboratorier i Norge tilbyr analyse av THC-syre i biologiske prøver som urin, hår, plasma og serum [19]. Ved Oslo Universitetssykehus (OUS) benyttes LLE ved håranalyser, mens ved urinprøver benyttes *supported* væske-ekstraksjon (*supported liquid extraction*, SLE) som er en variant av LLE. Isolering av THC-syre i følgende biologiske prøver kan dermed være et interessant applikasjonsområde for EME, ettersom det vil både være tidsbesparende og forenkle mye av forarbeidet som gjøres rutinemessig.

## 1.2 Hensikt

Hensikten med oppgaven var å forsøke å anvende EME til ekstraksjon av THC-syre fra biologiske prøver som urin og hår ved hjelp av kommersielt utstyr under utvikling av Extraction Technology Norway AS. Målet med oppgaven var å undersøke betingelser som kunne legge til rette for ekstraksjonen. EME har foreløpig ikke blitt benyttet til å ekstrahere THC-syre fra biologiske prøver. Oppgaven representerer dermed både et nytt potensielt applikasjonsområde for EME og en utvidelse av kunnskapen om bruk av EME til ekstraksjon av syrer. Bruk av kommersielt utstyr vil kunne forenkle forarbeid på laboratorier samt være tidseffektivt. Dette kan bidra til å øke interessen for EME.

**Hensikten med oppgaven kan punktvis fremstilles på følgende måte:**

- Anvende EME for THC-syre
- Ekstrahere THC-syre fra urin og hår
- Gjennomføre analyse av ekstraktene på UHPLC-MS/MS
- Optimalisere ekstraksjonsbetingelser
- Evaluere metoden



- Vurdere muligheten av metoden for kvantitativ anvendelse

De innledende forsøkene med optimalisering av ekstraksjonsparametere for vandige prøveløsninger ble utført med 96-brønnersformat for å finne et ideelt system som kunne benyttes med det kommersielle utstyret for ekstraksjon av THC-syre.

## 2 Teori

### 2.1 Cannabis

Cannabis er en fellesbetegnelse på narkotiske stoffer som stammer fra en underart av hamp-planten, kalt *Cannabis sativa*, og stoffgruppen inneholder svært mange kjemiske substanser [20]. Blant dem finnes det en gruppe kjemisk beslektede substanser kalt cannabinoider, hvorav mange av disse er psykoaktive. De mest omtalte og studerte cannabinoidene er delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) som utgjør den viktigste psykoaktive komponenten i cannabis-planten, og cannabidiol (CBD) [21]. I motsetning til THC er CBD mindre potent og utøver ikke psykotropiske effekter [22]. THC kan oksideres til et mye mindre potent cannabinoid kalt cannabinol (CBN), som er også blitt mye studert. Dette kan skje når THC utsettes for lys, varme eller luft [22].

Cannabinoidene virker på det endogene cannabinoid systemet som gir den psykotropiske virkningen av cannabis [21]. Effekten på dette systemet kan fremkalle en rus som vanligvis gir eufori, avslapning, og endret oppfatning av tiden og virkeligheten. Andre virkninger som induseres av cannabinoidene kan være angst, redusert kapasitet til å lære og huske, samt paranoia og hallusinasjoner [23, 24]. Disse er gjerne uønskede virkninger ved cannabis. I motsetning til THC som gir rusvirkningen, anses virkningen av CBD å være dempende på flere av de uønskede virkningene ved THC. CBD har blant annet vist å ha antipsykotisk og anxiolytisk effekt [25]. Dermed vil effektene av THC kunne ble modulert av CBD.

Det finnes en rekke cannabisprodukter på markedet, både lovlig og illegalt, noe som gjør at cannabis kan inntas på flere ulike måter. Røyking er den vanligste administrasjonsmåten, hvor marihuana eller hasj blandet med tobakk blir rullet i såkalte *joints* og røyket. Dette skyldes den raske absorpsjonen av THC-syre fra lungene og rask fordeling av substansen utover kroppen og er den mest effektive måten å oppnå psykoaktive effekter av cannabis [22, 26, 27]. Andre måter å innta cannabisprodukter er å spise det etter tilsetning i forskjellige matvarer som for eksempel kaker, drikke som te eller smøre inn i huden i form av hudkrem eller olje [22, 28].

### **2.1.1 Bruk av cannabis**

Bruk av cannabis er fortsatt et stort tema både på nasjonalt og internasjonalt nivå. Det stilles spørsmål om den terapeutiske verdien av cannabis, cannabispreparater og legemidler basert på cannabis. Med andre ord er dette et dynamisk og komplekst saksfelt.

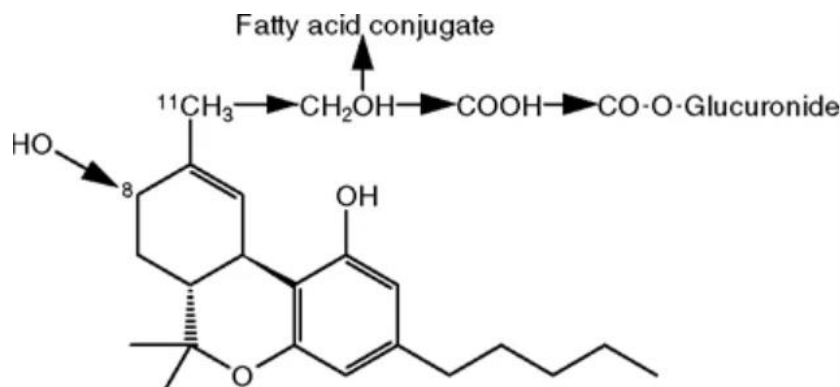
I Norge er cannabis det mest brukte illegale narkotiske stoffet, hvor det er blitt observert en økende trend blant unge i alderen 16-24 de senere år [29]. Fordi cannabis blir mye brukt og har en relativt lang påvisningstid i urin, blir dette rusmidlet ofte påvist i rusmiddelanalyser.

Cannabis har i senere tid også blitt brukt i terapeutisk sammenheng i Norge, da enkelte pasienter som er alvorlig syke kan ha nytte av medisinsk cannabis. Dette kan gjelde for pasienter med blant annet alvorlige kreftsykdommer eller kronisk sterke smerter som ikke får tilstrekkelig lindring av godkjente legemidler som markedsføres i Norge. Behandling med medisinsk cannabis er strengt regulert, slik at følgende behandling må søkes av leger som har rekvireringsrett for legemidler i reseptgruppe A [30]. Dette gjelder cannabispreparater som inneholder inntil 1 % THC, mens høyere THC-innhold kan kun søkes av spesialister i sykehus. Sativex er i dag det eneste legemidlet på det norske markedet som har markedsføringstillatelse og inneholder ekstrakt fra cannabisplante (nabiksimoler).

## **2.2 THC-syre**

THC metaboliseres hovedsakelig i leveren hvor cytokrom P450 enzymene CYP2C9, CYP2C19 og CYP3A4 er involvert [22]. Dette er en totrinnsprosess: fase 1-metabolisme og fase 2-metabolisme. I fase 1 gjennomgår THC-molekylet ulike kjemiske reaksjoner for å danne molekyler som er mer vannløselige (metabolitter). Vanlige reaksjoner som er involvert i dette trinnet er hydroksylering og oksidering. I fase 2 konjugeres metabolittene vanligvis med glukuronsyre og fører til at vannløseligheten øker ytterligere [22].

Det er blitt identifisert over 100 metabolitter for THC [31]. Hovedmetabolittene som dannes er 11-OH-THC og THC-COOH (heretter kalt THC-syre). Mer enn 65 % av metabolittene skilles ut i avføring, mens omtrent 20 % skilles ut i urin [32]. Den dominerende metabolitten i urin er THC-syre, hvor mesteparten av metabolittene foreligger i konjugert form [32]. THC-syre er derfor den viktigste metabolitten i rusmiddelanalyser. Figur 1 viser dannelse av THC-syre fra THC.



**Figur 1** Metabolismevei for dannelse av THC-syre hvor det skjer en hydroksylering av C11, som er det vanligste angrepspunktet ved metabolisme av THC. Figuren er hentet fra [32].

### 2.2.1 THC-syre i biologiske prøver

Det er mulig å detektere THC og metabolitter av THC i ulike biologiske væsker som plasma, spytt og urin, samt biologisk matriks som hår. Både urin- og håranalyser blir rutinemessig brukt i klinisk og rettsmedisinsk sammenheng. For å avkrefte eller bekrefte bruk av cannabis blir som regel THC-syre identifisert i urinprøver, som benyttes i økende grad for å avdekke inntak av rusmidler. Da THC-syre har en lang eliminasjonshalveringstid, er det vanskelig å forutsi når cannabis ble inntatt [22]. Dermed vil et positivt utslag av THC-syre kun påvise eksponeringen av cannabis. Resultatet fra følgende analysene vil heller ikke kunne gi informasjon i forhold til administrasjonsvei eller cannabis-mengde som er blitt inntatt.

THC og THC-syre kan inkorporeres i hår gjennom flere ulike mekanismer. Substansene kan inkorporeres i håret gjennom kapillærer som omringer hårsekken, og ved diffusjon inn i håret fra svette eller talg som skilles ut på hårskaftet og hudoverflaten [22]. Ettersom cannabis vanligvis inntas ved røyking, er det ikke usannsynlig at håret vil kunne forurennes med THC. Ved utførelse av håranalyser er det hovedsakelig THC-syre som identifiseres, som er en fordel da THC-syre ikke finnes i cannabis-røyking. På denne måten kan man eliminere risiko for ytre forurensninger [22]. Håranalyser byr på noen fordeler i rettslig sammenheng da det kan påvise eventuell langtidsbruk av cannabis, samtidig som det er lett å innhente slike prøver. Hårprøver kan i tillegg oppbevares i romtemperatur og trenger ikke å analyseres umiddelbart etter innhenting av prøve. Da THC-syre finnes i svært lav konsentrasjon i hår, krever det meget sensitive instrumenter. Gasskromatografi med tandem MS (GC-MS/MS) blir derfor ofte benyttet ved analyse av hårprøver [22].

## 2.3 Prøveopparbeidelse

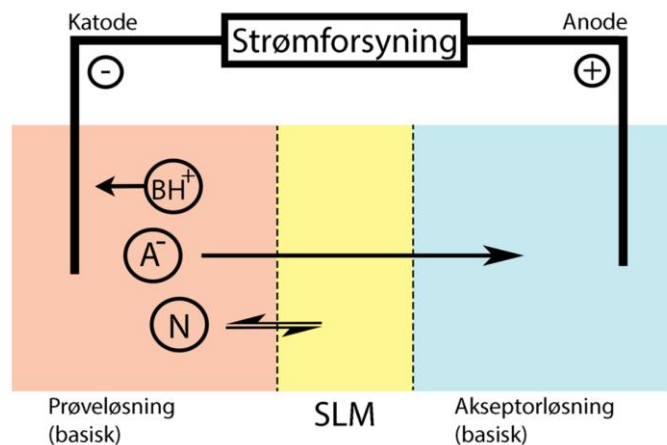
Det eksisterer mange metoder for prøveopparbeidelse, med et fellesmål å klargjøre en prøve for analyse. Behovet for prøveopparbeidelse avgjøres av sammensetning av prøven, analyttens konsentrasjon i prøven og dens egenskaper. Som nevnt innledningsvis er biologiske prøver svært komplekse og kan medføre skader eller ødeleggelse av instrumentet ved direkte injisering på instrument. Legemidler av interesse kan i tillegg foreligge i meget lav konsentrasjon som vanskeliggjør kvantifisering og deteksjon [3]. Dermed er prøveopparbeidelse et essensielt trinn før prøvene analyseres i forbindelse med rus- og legemiddelanalyser, da lave konsentrasjoner og komplekse prøver er typiske utfordringer ved slike analyser.

De vanligste metodene for prøveopparbeidelse er PPT, SPE, LLE og delvis DAS [1-3]. I PPT beholdes analytt i prøven, mens forurensninger blir fjernet ved tilsetning av proteinfellingssreagens. I metodene SPE og LLE blir analytt ekstrahert ut av prøven. DAS baserer seg på fortynning av prøve, og er med andre ord en metode i motsetning til SPE og LLE som hverken isolerer analytt eller fjerner potensielle interferenser.

## 2.4 Elektromembranekstraksjon (EME)

Elektromembranekstraksjon (EME) er en prøveopparbeidelsesmetode som kan benyttes for ekstraksjon av analytter fra vandige prøveløsninger. EME er en videreutvikling av tre fase væske-fase-mikroekstraksjon (*liquid-phase microextraction*, LPME) [9]. I motsetning til bruk av passiv diffusjon i LPME som drives av en pH-gradient, er spenning over membranen drivkraften bak ekstraksjonen i EME. EME baserer seg dermed på elektrokinetisk migrasjon hvor ioniserte analytter i løsninger vandrer under påvirkning av et spenningspotensial [9]. I dette systemet vil motsatte ladninger tiltrekke hverandre, mens like ladninger vil frastøte hverandre. Det vil si at negativt ladde analytter (anioner) vil migrere mot positiv elektrode (anode), mens positivt ladde analytter (kationer) vil migrere mot negativ elektrode (katode).

Prinsippet bak EME er illustrert i Figur 2 og viser ekstraksjon av sure analytter. EME er et tre-fase system bestående av donorfase, akseptorfase og en organisk væskemembran (*supported liquid membrane*, SLM). I dette systemet blir analyttene (kationene) i prøveløsningen ekstrahert gjennom en SLM til en akseptorløsning, mens nøytrale og basiske forbindelser blir værende i prøveløsningen. Det er et spenningsfelt som driver denne ekstraksjonen.

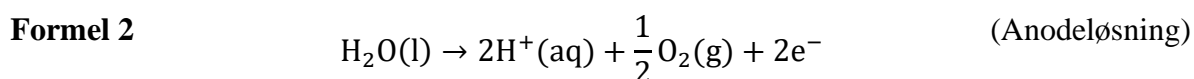
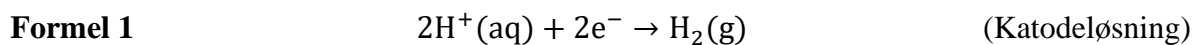


**Figur 2** Skjematisk illustrasjon av EME for sure analytter ( $A^-$ ), hvor  $BH^+$  er basiske forbindelser og N er nøytrale forbindelser.

Migrasjon av analytter gjennom SLM påvirkes av flere parametere. Dette gjelder blant annet ekstraksjonsspenning og -tid, valg av organisk løsemiddel til SLM, pH i donor- og akseptorløsning som påvirker selektiviteten og effektiviteten av ekstraksjonen, samt andre parametere som risting.

### 2.4.1 Ekstraksjonsspenning og -tid

For at ekstraksjonen skal kunne utføres må det gå strøm i systemet, med andre ord må det gå strøm over membranen fra katode til anode. Siden det er ioner tilstede i prøveløsningen, vil de vandre når spenning blir satt på. Det dannes en sluttet krets og strømmen i systemet kan måles i ampere (A). Hvis analyttene og SLM ikke reagerer med elektroden, vil følgende elektrolyse-reaksjoner vist i Formel 1 og Formel 2 forekomme i katode- og anodeløsning ved EME [14]:



For EME av sure analytter hvor katoden er plassert i donor og anoden i akseptor, vil reaksjonen i Formel 1 skje i donor og Formel 2 skje i akseptor. For EME av basiske analytter hvor elektrodene er plassert motsatt, vil Formel 1 skje i akseptor og Formel 2 vil skje i donor.

$O_2$  og  $H_2$  dannes ved elektrodene og medfører bobledannelse, samtidig forbrukes og dannes  $H^+$ . Dette kan også medføre pH-forandringer i både donor- og akseptorløsning. Dannelse av bobler kan ha en del uheldige virkninger i EME-systemet. Boblene kan føre til et mindre stabilt og

effektivt system som følge av redusert kontaktflate mellom løsningene og SLM, som igjen medfører redusert elektrokinetisk migrasjon av analyttene. Samtidig vil det være mindre kontroll over volumet av løsningene [9].

Graden av elektrolyse styres av strømmen som går gjennom systemet, som igjen styres av motstanden og spenningen i systemet [9]. Dette er forklart i Ohms lov i Formel 3.

**Formel 3**

$$I = \frac{U}{R}$$

hvor I er den elektriske strømstyrken, R er motstand og U er spenning [33]. Da motstanden i SLM er mye større enn de vandige løsningene, er strømstyrken primært avhengig av denne. Dermed vil motstanden være avhengig av det organiske løsemidlet benyttet for dannelselse av SLM, og tykkelsen av SLM'en [9]. For at det skal være tilstrekkelig ledningsevne og penetrasjon av det elektriske feltet i EME-systemet, må SLM ha en viss ledningsevne. Høy ledningsevne vil kunne medføre elektrolyse, og dermed er valg av SLM meget viktig i EME. Studier har vist at ekstraksjonsutbyttet øker generelt ved økt spenning før ekstraksjonsutbyttet flater ut eller reduseres når den optimale spenningen er blitt oppnådd, og det oppnås en likevekt [9, 14].

Den optimale ekstraksjonstiden påvirkes i tillegg av spenningen som påføres, og må derfor også optimaliseres. Ekstraksjonsutbyttet øker stort sett med økende ekstraksjonstid inntil det oppnås en såkalt *steady-state* i systemet og ekstraksjonsutbyttet når sitt maksimum. Hvor lang tid det tar før det oppnås *steady-state* er avhengig av analyttene. Maksimalt ekstraksjonsutbytte allerede etter fem til ti minutter har blitt observert for mange analytter [34]. Ekstraksjonsutbyttet reduseres som regel ved lengre ekstraksjoner, da det også påvirker graden av elektrolyse.

### **2.4.2 Organisk væskemembran (SLM)**

SLM-materialet som benyttes består ofte av porøs polypropylen (PP) i form av hullfiber eller flate membraner, hvor det sistnevnte ble benyttet i oppgaven. Denne membranen holder donor- og akseptorfase separat, samtidig som den holder på det organiske løsemidlet gjennom kapillærkrefter.

Sammensetningen av SLM er en av de viktigste ekstraksjonsparameterne innen EME. Et ideelt løsemiddel bør ikke være for flyktig da det kan være fare for fordampning av SLM under EME.

Løsemidlet bør i tillegg ha meget lav vannløselighet for å unngå at SLM lekker ut i prøve- og akseptorløsning. Det er derfor ikke anbefalt å bruke løsemidler med vannløselighet høyere enn 1 g/l, som er vannløseligheten til alkoholen 1-oktanol [35]. Det er samtidig ikke ønskelig å benytte løsemidler med høy viskositet da det reduserer permeabiliteten av analyttene gjennom membranen. Da analyttene migrerer i et pålagt elektrisk felt, er det viktig at løsemidlet som benyttes til SLM har lav konduktivitet [35]. Det bør være lav fordeling og permeabilitet av bakgrunns elektrolytter og matriksioner fra prøveløsning. Dette er for å unngå overflødig strøm i EME-systemet. Det er også ønskelig å benytte et løsemiddel som er av høy renhet, da løsemidler med lav renhet kan inneholde forurensninger som kan lekkes til akseptorfase under ekstraksjonen [35].

Det mest anvendte løsemidlet i EME er 2-nitrofenyloktyleter (NPOE), som fyller alle de nevnte kravene for et idealt løsemiddel til SLM. NPOE har vist å være meget effektivt som SLM for ekstraksjon av upolare basiske legemidler ( $\log P > 1,5$ ) [9, 35, 36]. Det er blitt gjort flere studier for løsemidler til SLM for upolare basiske legemidler enn for polare basiske legemidler og sure legemidler. For upolare basiske legemidler er det ønskelig å bruke et løsemiddel med hydrogenbindingsakseptoregenskaper. Ved EME av polare basiske analytter ( $\log P < 1,5$ ) har en sammensetning av NPOE og bis(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) vist seg å være bedre for ekstraksjonen av slike analytter. DEHP øker transporten av de basiske analyttene inn i membranen ved at stoffet danner ionepar med de protonerte analyttene [34, 37]. For ekstraksjoner med upolare syrer ( $\log P > 1,5$ ) er det ønskelig å bruke et løsemiddel med hydrogenbindingsdonoregenskaper, og 1-oktanol og andre langkjedete alkoholer har vist å være mer effektive som SLM enn NPOE [36].

### 2.4.3 pH

En forutsetning for at analyttene skal kunne migrere i et EME-system er at de må være ladet. Avhengig av analyttens egenskaper justeres pH i donor- og akseptorfase høyere eller lavere enn deres  $pK_a$ -verdier for å ionisere dem. Ved EME av sure analytter benyttes høy pH i donor- og akseptorfase. I dette tilfellet vil anoden være plassert i akseptorfase slik at anionene kan migrere fra donorfase mot akseptorfase. Ved EME av basiske analytter vil det motsatte være tilfellet hvor donor- og akseptorfase surgjøres, og katoden plassert i akseptorfase [9].

Ettersom det oppstår et elektrisk felt over SLM, gir dette som nevnt mer effektive og raskere ekstraksjoner enn ved passiv diffusjon. Retningen og størrelsen på det elektriske feltet kan lett



endres, hvilket gir muligheten for god fleksibilitet og høy selektivitet med metoden. Når analyttene er ionisert vil de ha økt hydrofile egenskaper og vil ikke kunne diffundere over den hydrofobe organiske fasen til akseptorfasen [9]. De ioniserte analyttene migrerer inn i den organiske fasen ved påføring av spenning, hvor de fremdeles er løselige, og deretter ekstraheres de inn i akseptorfasen med pH som opprettholder ioniseringen. Da analyttene foreligger i sine ladete form i akseptorfasen, vil de som følge av ladning og retning på det elektriske feltet ikke kunne krysse tilbake over membranen igjen [9].

#### **2.4.4 Grad av risting**

Graden av agitasjon (risting) er en viktig parameter innenfor EME, da det påvirker effektiviteten av migrasjon av analytter over SLM, og bør derfor optimaliseres. 500 til 1000 rpm er ofte optimal [34]. Ristingen påvirker effektiviteten av ekstraksjonen da det sikrer tilstrekkelig påfylling av analytter i donor/SLM fase-grensesnittet (*phase interface*), som er nødvendig for høyt ekstraksjonsutbytte og korte ekstraksjonstider [35]. Ved lav grad av risting vil overføring av analytter fra bulk-donor til SLM være utilstrekkelig, mens sterk risting medfører bobledannelse og kan til dels undertrykke kontakten mellom donor og SLM.

#### **2.4.5 Ulike formater for EME**

Det har blitt utviklet en rekke EME-formater i de siste årene med hensikt å forbedre oppkonsentrering, ekstraksjonsutbytte og gjennomstrømming. Da EME er utviklet fra hullfiber LMPE (*hollow fiber-LPME*, HF-LPME), ble hullfiber format benyttet i de første publiserte studiene [9, 14]. Senere ble flate membraner utviklet, som ga opphav til on-chip EME [38, 39] og parallell-EME (Pa-EME) [40, 41]. Pa-EME baserer seg på 96-brønnersformat hvor det er praktisk mulig å ekstrahere 96 prøveløsninger om gangen. Dette formatet ble benyttet for de innledende forsøkene i denne oppgaven.

Det eksisterer per i dag ingen kommersielle utstyr for EME på markedet, men et slikt utstyr er under utvikling hos et norsk firma kalt Extraction Technology Norway AS. Dette utstyret kombinerer mange av de gode egenskapene ved ulike formater som allerede finnes for EME. Det som gjør utstyret spesielt, er at vialene er laget av strømledende polymer med en union med et filter for SLM i midten. Akseptorvialen kan i teorien settes direkte i autosampleren i LC uten å overføre ekstraktene til andre vialer.

## 2.5 Væskekromatografi (LC)

Væskekromatografi (*liquid chromatography*, LC) er en separasjonsmetode for analytter hvor analyttene injiseres i en mobilfase (væske) som frakter dem igjennom en kolonne bestående av fast stasjonærfase. Sammensetningen av mobilfasen kan være lik under hele analysen (isokratisk eluering) eller endres underveis (gradienteluering). Hva som brukes er avhengig av analyttenes fysikalsk-kjemiske egenskaper. I kolonnen retarderes analyttene som følge av interaksjon mellom analyttene og stasjonærfasen, som er bundet til porøse partikler. Dette medfører ulik fordeling av analyttene mellom mobil- og stasjonærfase. Analyttene blir dermed separert basert på retensjonsforskjell [42]. Det finnes ulike prinsipper for væskekromatografi, avhengig av valg av kolonnens pakkemateriale og mobilfasesammensetning. I denne oppgaven ble omvendt-fase-kromatografi benyttet.

### 2.5.1 Omvendt-fase-kromatografi

Omvendt-fase-kromatografi er det mest anvendte og viktigste separasjonsprinsippet innen væskekromatografi [43, 44]. Analyttene retarderes som følge av hydrofobe interaksjoner med stasjonærfasen. Stasjonærfasen består av sfæriske silika-partikler som er modifisert med mer eller mindre hydrofobe organiske molekyler, hvilket avgjør hydrofobisitet av partiklene. Den mest brukte stasjonærfasen er oktadecylsilisilika som har kjeder med 18 karbonatomer (C18) på overflaten av silikaen [43-45].

Mobilfasen som benyttes i omvendt-fase-kromatografi består ofte av vandige løsninger med blandbart organisk løsemiddel. Metanol er ofte første valget da det er rimeligere og mindre toksisk enn acetonitril [44]. Mobilfasens elueringsstyrke bestemmes av innholdet av organisk løsemiddel. Retensjonen av analyttene avtar ved økende elueringsstyrke da interaksjonen mellom analytt og stasjonærfase reduseres [44]. For nøytrale analytter styres retensjonen kun av innholdet av organisk løsemiddel i mobilfasen, og påvirkes ikke av pH. Retensjonen av syrer og baser påvirkes derimot av pH, i tillegg til innholdet av organisk løsemiddel. Ved endring av de nevnte parameterne kan separasjonsselektiviteten av slike analytter endres. pH i mobilfasen kan justeres ved tilsetning av buffer (eksempelvis maursyre). Hydrofobe syrer separeres typisk ved pH som undertrykker ioniseringen (lav pH) og høyt innhold av organiske løsemidler (høy elueringsstyrke).

## 2.5.2 Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC)

Væskekromatografi utføres med instrumenter kalt *high performance liquid chromatography* (HPLC) og *ultrahigh performance liquid chromatography* (UHPLC), som er en videreutvikling av HPLC. Hovedforskjellen er at det generelt benyttes kortere kolonner med mindre partikkelstørrelse i UHPLC enn HPLC. UHPLC gir dermed mulighet for effektive analyser på kortere tid som følge av kortere transportveien gjennom kolonnen.

Kolonnens effektivitet kan måles i høydeekvivalenten til en teoretisk plate (HETP eller H) og indikerer båndspredningen i kolonnen. H er gitt i den empiriske van Deemters ligningen (Formel 4) som beskriver forholdet mellom H og lineær hastighet av mobilfase, og faktorer som påvirker H: eddydiffusjon, longitudinal diffusjon og masseoverføring [46].

**Formel 4**

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

$H$  = platehøyde

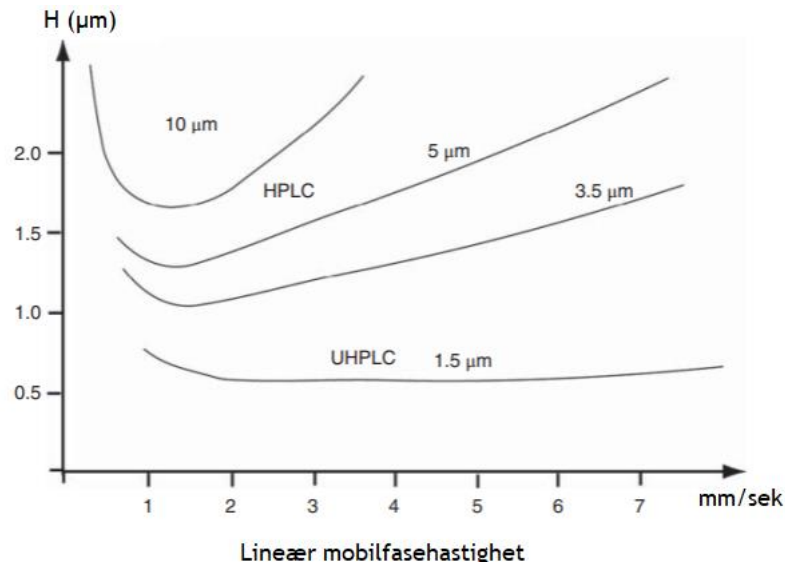
$A$  = eddydiffusjon

$B$  = longitudinal diffusjon

$C$  = masseoverføring

$u$  = mobilfasehastighet

Hastigheten av mobilfase ( $u$ ) påvirker den relative betydningen av hver enkelt faktor, mens partikkelstørrelse og form samt andre faktorer påvirker platehøyden ( $H$ ). Da partikkelstørrelse inngår som en av variablene, kan van Deemters ligning benyttes til å undersøke optimal mobilfasehastighet for høy kolonneeffektivitet. Sammenhengen mellom  $H$  og mobilfasehastighet kan illustreres i et van Deemters plott hvor hastigheten er gitt for ulike partikkelstørrelser. Figur 3 viser at det oppnås bedre effektivitet (lav  $H$ ) ved mindre partikkelstørrelser selv ved høy hastighet av mobilfase.



**Figur 3** Van Deemters kurve for partikkelstørrelse 10, 5, 3,5 og 1,5  $\mu\text{m}$  hvor endring av  $H$  er en funksjon av mobilfasehastighet. Mindre partikler gir lavere  $H$  (bedre effektivitet), men krever UHPLC-instrument. Figuren er oversatt og hentet fra [43].

Ettersom effektiviteten er proporsjonal med lengden av kolonnen og invers proporsjonal med partikkelstørrelsen, vil det ikke medføre tap av effektivitet ved reduksjon av kolonnenlengden med samme faktor som partikkelstørrelsen. UHPLC gir dermed mulighet for kortere kolonne. Det kan i tillegg benyttes kolonner med liten indre diameter med UHPLC. Mindre partikkelstørrelse og liten indre diameter generer derimot meget høyt trykk i systemet, noe som UHPLC er i stand til å håndtere [46]. Dette gir en rekke fordeler med instrumentet; det oppnås mindre fortykning av analytter (mer konsentrert), samt lavere deteksjonsgrense for konsentrasjonsavhengige detektorer og lavere forbruk av mobilfase [43, 45]. Det kan i tillegg analyseres små prøvevolum med kortere analysetid uten negativ innvirkning på effektivitet.

## 2.6 Massespektrometri (MS)

Massespektrometri (MS) koblet til en HPLC/UHPLC benyttes mye innenfor bioanalyse for å detektere analytter som elueres ut av kolonnen. Kombinasjonen av disse instrumentene er definert kort som LC-MS eller UHPLC-MS. Disse er i dag de mest brukte instrumentene innen kvantitativ bioanalyse da de gir kortere analysetider, kan detektere lave konsentrasjoner av analytter og har høy selektivitet [2].

Et massespektrometer er satt sammen av en ionekilde, en masseanalysator og en detektor. Da analytter blir separert og detektert basert på deres forhold mellom masse og ladning (masse-til-

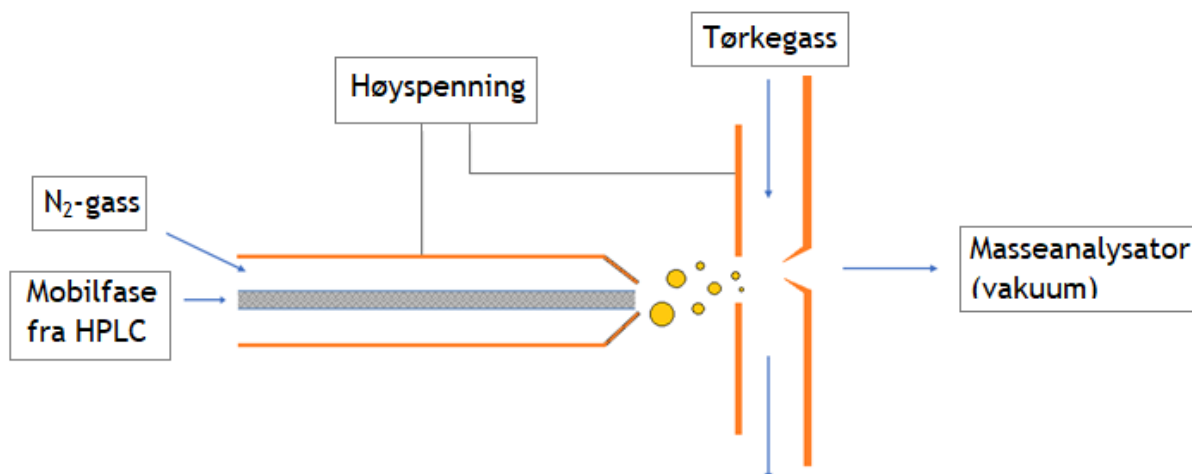
ladningsforhold,  $m/z$ ), krever denne deteksjonsteknikken at analyttene er ionisert og overføres til gassfase før de når masseanalysatoren. Mobilfasen som benyttes må derfor være flyktig ettersom alt som elueres fra kolonnen skal overføres til gassfasen.

Ioniseringen kan skje under forskjellige forhold avhengig av analyttens egenskaper. For analytter med ioniserbare grupper kan ioniseringen skje ved å justere pH i mobilfasen i LC, eller i selve ionekilden som er den første komponenten som analyttene kommer i kontakt med etter kromatografisk separasjon. For analytter uten ioniserbare grupper er det ikke mulig å ionisere i mobilfasen. Ioniseringen for slike analytter må da skje ved hjelp av ionekilden. Utgangen av kolonnen i LC er koblet direkte til den såkalte *interface* i MS, som overgangen mellom LC og MS, og det er her væskefasen går over til gassfase [43]. Ved *interface* ioniseres analyttene under atmosfærisk trykk.

Etter ionisering akselereres de ladede analyttene inn i masseanalysatoren og separeres basert på deres  $m/z$ -verdier [47]. Dette skjer under vakuumbetingelser (lavt trykk). Massespektrometeret holdes ved høyt vakuum for å unngå at ionene kolliderer med gassmolekyler fra luften, og dette medvirker til at ionene når frem til analysatoren [43]. Deretter registreres mengden av ioner og  $m/z$ -verdier av ionene av en detektor.

### **2.6.1 Elektroprayionisering (ESI)**

Det finnes flere ulike ionekilder som benyttes til ulike formål. I denne oppgaven ble elektroprayionisering (ESI) benyttet, som er godt egnet for ionisering av analytter med polare grupper og utføres ved atmosfærisk trykk. En skjematisk fremstilling av denne prosessen er vist i Figur 4.



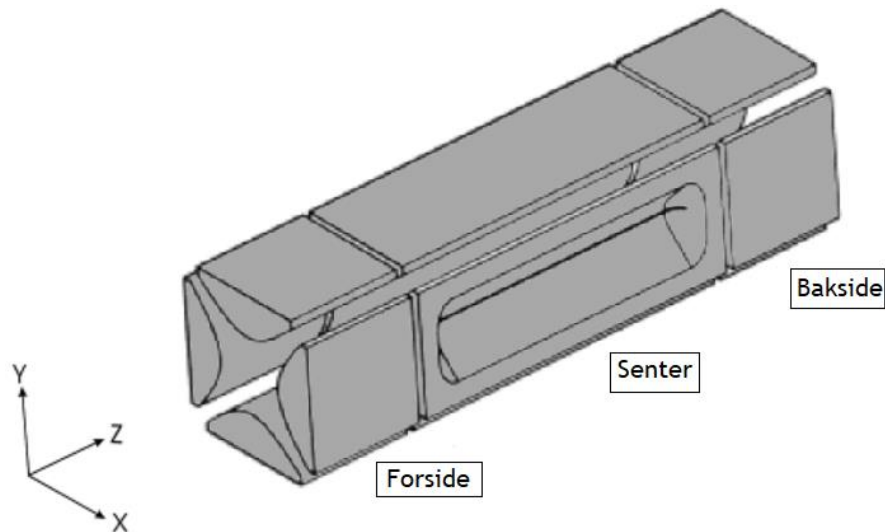
**Figur 4** Skjematisk fremstilling av elektrospyionisering (ESI). Figuren er modifisert fra [47]

Mobilfase med analytt (eluat) føres inn i massespektrometeret gjennom et trangt kapillærrør hvor det blir påført en høy spenning på typisk 2-5 kV [47]. Spenningen som påføres kapillærrøret er enten positivt eller negativt, avhengig av analyttens ladning. Ved utgangen av kapillærrøret blir eluatet blandet med forstøvergass, ofte bestående av nitrogengass ( $N_2$ -gass), som bidrar til dannelse av en aerosol. Aerosol-dråper som forlater kapillærrøret er høyt ladet som følge av akkumulering av ioner forårsaket av den høye spenningen [43]. I motsatt retning av aerosolen blir det introdusert en tørke-gass for å fordampe aerosol-dråpene. Etter hvert som mobilfasen fordampes, blir aerosol-dråpene stadig mindre. Dette medfører en økning i den frastøtende elektrostatiske kraften mellom ionene av samme ladning inne i dråpene. Når den frastøtende kraften overstiger overflatespenningen vil dråpen sprekke og gi opphav til nye, men mindre dråper. Disse nye dråpene gjennomgår samme prosess. Dette er en repeterende prosess som til slutt gir ioner i gassfasen som skjer ved fordampning av enten ioner eller dråper [43].

Etter ionisering og overføring til gassfase, blir ionene fraktet frem til masseanalysator under vakuum. I denne oppgaven ble to ulike masseanalysatorer benyttet, en to-dimensjonal ionefelle (lineær ionefelle) og en trippel kvadrupol.

### 2.6.2 Lineær ionefelle

I en ionefelle-MS blir de ioniserte analyttene fraktet i høy fart videre fra ionekilden til ionefellen, som er i prinsippet et lite sirkulært kammer bestående av tre deler. En skisse av en lineær ionefelle er vist i Figur 5.

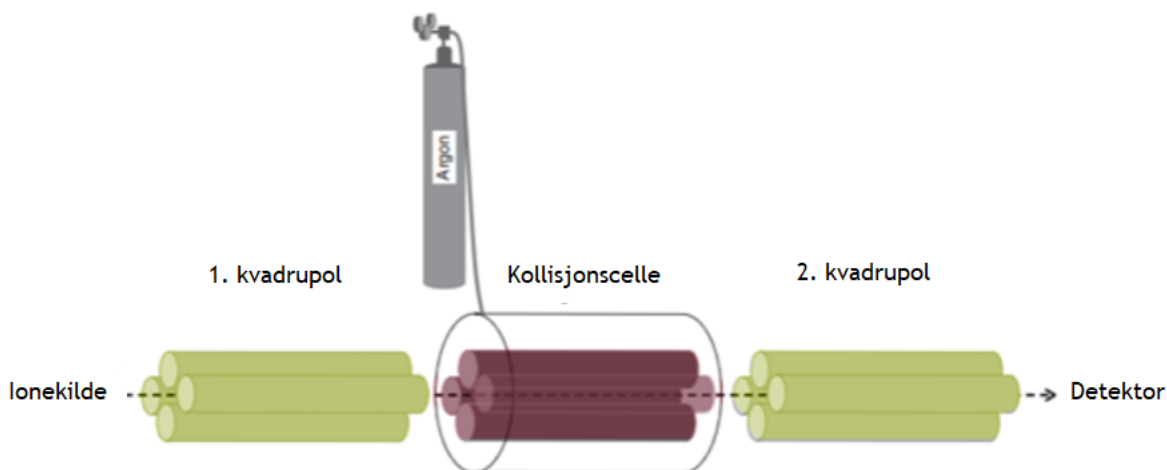


**Figur 5** Skjematiske illustrasjon av en lineær ionefelle bestående av tre deler. Figuren er modifisert fra [48]

Hver av delene består av fire parallelle stenger som ligner på kvadrupoler. De ytterste delene på ionefellen har spenning av lik polaritet, dermed blir ioner som fraktes inn i ionefellen fanget i den midterste delen [43]. Ionene holdes på plass aksialt og radially av henholdsvis likestrøm og radiofrekvent spenning (RF), hvilket som gjør at ionene oscillerer [48, 49]. I den midterste delen (senter) av ionefellen kan man destabilisere ionene som ikke er av interesse. Ionet med ønsket  $m/z$ -verdi bli dermed værende igjen og kan analyseres. Det er i tillegg mulig å fragmentere ionene med ionefelle, som refereres som tandem massespektrometri (MS/MS). Ionet i MS/MS akselereres slik at det har høy nok fart til å kolliderer med heliumatomer som er tilstede i masseanalysatoren og dermed fragmentere [43]. Fragmentene blir deretter samlet i den midterste delen og analysert.

### 2.6.3 Trippel kvadrupol (QqQ)

En trippel kvadrupol består av tre kvadrupoler (QqQ) som er plassert etter hverandre i et massespektrometer, hvor den midterste kvadrupolen er en kollisjonscelle. De to andre kvadrupolene fungerer som masseanalytatorer, vist i Figur 6.



**Figur 6** Skjematisk illustrasjon av en trippel kvadrupol. Figuren er oversatt og modifisert fra [43]

Hver kvadrupol består av fire like stenger som er plassert parallelt ovenfor hverandre. Det ene paret av stengene står motsatt av hverandre og påføres lik likestrøm og RF, mens det andre paret blir påført motsatt likestrøm og RF. Dette medfører dannelse av et oscillerende elektrisk felt [43]. Ionene fra ionekilden fraktes inn i den første kvadrupolen og dermed inn i dette oscillerende feltet. Noen ioner vil oscillere i en stabil bane, andre i ustabil bane. Det som avgjør om ionene oscillerer i en stabil eller ustabil bane, er deres  $m/z$ -verdi. Ionene med stabil bane vil kunne nå frem til kollisjonscellen i motsetning til de med ustabil bane, da de vil kollidere med en av stengene i kvadrupolen. Dermed vil kun ionet med rett  $m/z$ -verdi nå frem til kollisjonscellen. I kollisjonscellen blir ionene fragmentert som følge av *collision-induced dissociation* (CID), som er en reaksjon mellom ioner og inerte gassmolekyler (eksempelvis argon). Disse fragmentene blir deretter fraktet til den siste kvadrupolen, hvor de blir detektert.

## 2.7 Statistisk forsøksdesign

Statistisk forsøksdesign (*design of experiments*, DOE) er prosessen som omfatter planlegging og utforming av forsøk med den hensikt at passende data resulterer i gyldige og objektive konklusjoner [50]. Dataene som blir samlet inn, analyseres da med statistiske metoder. DOE har som formål å utforske, kartlegge og lage en modell for responsen (eventuelt flere responser) innenfor et gitt reaksjonsområde bestående av alle involverte faktorer, hvor flere varieres samtidig i det forhåndsplanlagte forsøket [51]. På denne måten kan det undersøkes hvordan en enkel uavhengig variabel (faktor) påvirker responsen eller responsene. Dette kan gjøres ved å observere om endringer i de uavhengige variablene korrelerer med endringer i responsen eller responsene (de avhengige variablene), samt undersøke om det er noen interaksjoner mellom



variablene. Ettersom teorien bak DOE er meget omfattende, vil kun relevante teknikker (strategier) bli belyst.

En eksperimentell strategi som benyttes mye i praksis er den såkalte *one-factor-at-a-time* (OFAT). I OFAT velges et utgangspunkt for hver faktor og deretter varieres hver faktor over deres rekkevidde mens de andre faktorene holdes konstant [52]. Med andre ord er det kun en faktor som endres om gangen i stedet for flere. Til tross for at denne teknikken er enkel, krever den mye tid og arbeid, da det ofte er nødvendig å utføre svært mange individuelle forsøk (også kjent som *runs*), særlig når et stort antall parametere skal undersøkes. Ettersom det undersøkes kun en variabel om gangen, utelukker denne teknikken potensielle interaksjoner mellom faktorene. Interaksjoner mellom faktorer forekommer ofte, og dersom disse ikke tas i betraktning, kan det medføre dårlige eller uforventede respons (utfall) som kan være vanskelig å tolke.

Faktoreffekten er definert som responsendringen som følge av en endring i faktornivået. Dette kalles hovedeffekt. Med andre ord er dette responsen av faktorene alene. I enkelte forsøk kan det observeres at forskjellen i respons mellom nivåene til en faktor er ulik på alle nivåer for de andre faktorene [52]. Dette kalles for interaksjon mellom faktorene, og er med andre ord når effekten av den enkelte faktor er avhengig av nivået for én eller flere andre faktorer.

Ved håndtering av flere faktorer kan multivariierende teknikker benyttes, hvor flere variabler blir variert samtidig fremfor én variabel om gangen. En ofte anvendt multivariierende teknikk er faktorforsøk. Vanligvis benyttes et såkalt  $2^k$  oppsett for slike forsøk, som er et av de mest kjente oppsettene. Det vil si at dersom det er  $k$  antall faktorer, ville oppsettet på faktorforsøket med antagelse at hver faktor har to nivåer, som regel kreve  $2^k$  forsøk [52]. Dette kalles for et fullt faktorforsøk. Antallet forsøk vil imidlertid også være høyt så lenge mange faktorer er involvert, men det er ofte ikke nødvendig å gjennomføre alle testene for alle mulige kombinasjoner av faktornivåer. Redusert faktorforsøk (*fractional factorial experiment*) er en modifisert teknikk med utgangspunkt i faktorforsøk hvor det kun benyttes et mindre antall forsøk.

Faktorforsøk har en rekke fordeler ovenfor OFAT. I motsetning til OFAT, som varierer en variabel om gangen, kan det i faktorforsøk undersøkes mulige interaksjoner mellom involverte faktorer i forsøket. Faktorforsøk er dessuten mer effektivt enn OFAT med tanke på tid og kostnader da det oppnås mye informasjon ved bruk av like mye eller kortere tid. Optimale

betingelser kan oppnås raskere med faktorforsøk enn med OFAT, hvor det må utføres betydelig mange forsøk av forskjellige faktornivåer til enhver faktor inntil det oppnås maksimal respons for å kunne finne optimale betingelser [51]. Det er i tillegg mulig å undersøke flere faktorer uten ekstra kostnader i faktorforsøk. Etersom faktorforsøk muliggjør estimering av effektene til en faktor, samt effektene ved forskjellige nivåer til en annen faktor, resulterer det i konklusjoner som kan benyttes i en rekke eksperimentelle forhold [53].

Et  $2^k$  fullt faktorforsøk har  $k$  faktorer med to nivåer for hver av dem, og  $n = 2^k$  forsøk bestående av alle mulige kombinasjoner av nivåene av  $k$  faktorer. Det enkleste oppsettet i  $2^k$ -forsøk består av lavest antall faktorer, samt nivåer. For eksempel involverer to faktorer i forsøket, eksempelvis A og B, hvor det utføres forsøk på to nivåer av hver faktor. Dette oppsettet kalles for et  $2^2$  faktorforsøk. Nivåene som benyttes kan beskrives med høyt og lavt nivå. Disse nivåene er ofte benevnt som forholdsvis -1 og +1, og kan enten være kvantitative eller kvalitative. I de fleste faktorforsøk er faktorene og deres nivåer kvantitative [54]. Data fra disse multivarierte forsøk blir vanligvis analysert med variansanalyse eller regresjonsanalyse.

Det er ønskelig å oppnå linearitet med faktoreffektene for faktorforsøk på to nivåer, men det er ikke nødvendig med perfekt linearitet [53]. Det vil si at  $2^k$  forsøket vil fungere bra til tross for omtrentlig lineærtilnærming, som er avhengig av hvor stort omfanget av avviket fra linearitet er. En måte å oppdage avvik fra linearitet og modellere det, er å legge til såkalte senterpunkter (*center points*). Senterpunkter er nyttige for å undersøke og estimere krumning i respons. Etersom senterpunktene er spredd jevnt utover i forsøkssekvensen, kan de også gi et mål på prosesstabilitet og eventuelt informasjon om modellen som benyttes er pålitelig. I motsetning til kombinasjoner av faktorer som analyseres i teorien kun en gang, analyseres senterpunktene flere ganger. Ved å utføre flere forsøk (replikater) med senterpunkter blir dataene oppnådd i forsøksoppsettet mer sikker, og dermed blir analysen også mer sikkert. Senterpunkter benyttes når det antas at de  $k$  faktorene er kvantitative, og disse kan ha verdier i midten av nivåskalaen [54]. Dersom verdien for lavt nivå er en og verdien for høyt nivå er fem, vil senterpunktet dermed være tre.

Et mer komplekst og utvidet oppsett av faktorforsøk er respons-overflatemodell (*response surface model*, RSM). RSM er en samling av statistiske og matematiske teknikker som er praktisk for analyse og modellering av problemer forbundet med respons som påvirkes av flere variable, og er dermed nyttig for å utvikle, forbedre og optimalisere prosesser og systemer [55]. Med følgende hensikt benyttes faktorpunkter på både -1 og +1, senterpunkter betegnet med 0

og såkalte stjernepunkter (*star points/axial points*) som ligger utenfor faktorpunktene (eksempelvis på -2 og +2). Nivået på stjernepunktene er begrenset i forhold til antall involverte faktorer, samt nivåer som er praktisk mulig å undersøke. Stjernepunktene gir informasjon om ekstreme verdier og bidrar dermed til estimering av krumning i respons, samt bidrar til mer sikker analysemodell ved oppnåelse av flere datapunkter slik som nevnt for senterpunktene.

I motsetning til et vanlig to-nivå faktorforsøk som kun kan demonstrere om en faktor har en positiv eller negativ effekt på responsen (eller responsene), kan et RSM oppsett benyttes til å forutsi den eksakte størrelsen på effekten. Med andre ord er RSM mer informativt enn to-nivå faktorforsøk.

RSM kan benyttes for optimalisering av forsøksparametere (faktorer) da modellen kan beskrive hvordan systemet eller prosessen opptrer i hele området med alle involverte faktorer. Ved anvendelse av RSM er det mulig å forutsi hvilken grad responsen påvirkes ved overgang fra et faktoroppsett til et annet [55].

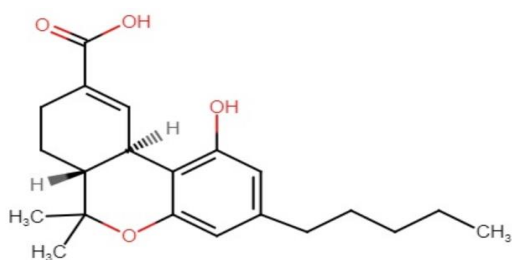
# 3 Material og metode

## 3.1 Analyttkarakteristikk

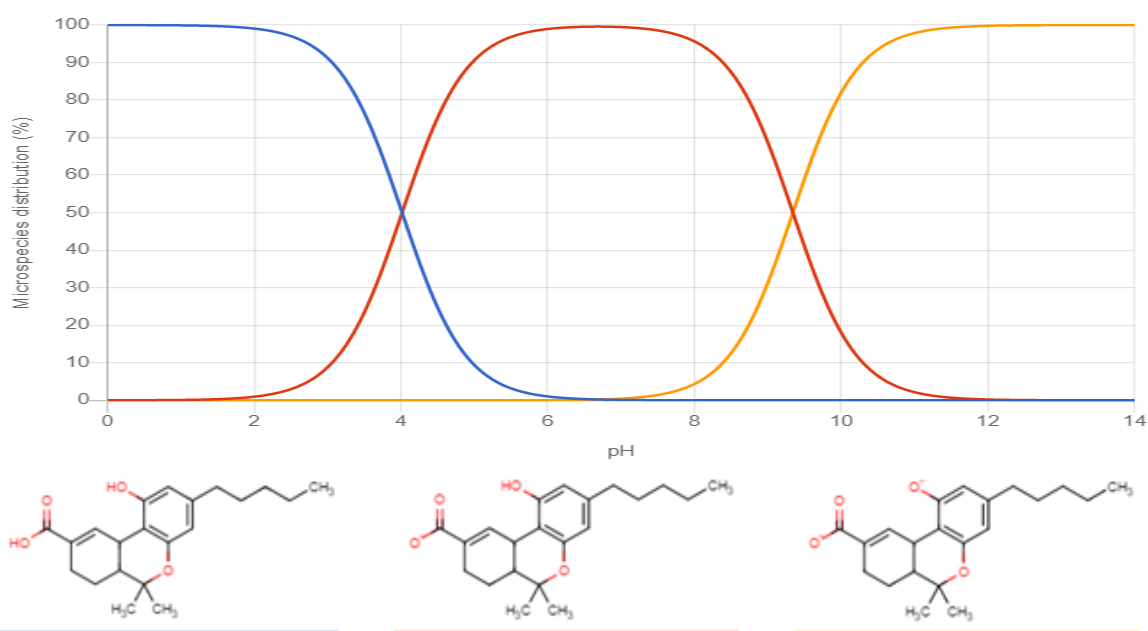
Fysikalsk-kjemiske egenskaper av analytten som er benyttet i oppgaven, er presentert i Tabell 1 og strukturformelen av analytten er vist i Figur 7. Figur 8 viser pH-områder hvor analytten foreligger i nøytral eller ladet form.

Tabell 1 Analyttkarakteristikk av THC-syre [56]

Navn	Molekylformel	pKa	log P	Molekylvekt (g/mol)
THC-syre (11-nor-karboksy-delta-9-THC)	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>4</sub>	4,02	5,14	344,4



Figur 7 Kjemisk struktur for THC-syre



Figur 8 Illustrasjon av fordeling av THC-syre i dens uladet og ladet form ved ulike pH-områder, hentet fra [56]. Blå graf: nøytral, uladet THC-syre. Rød graf: negativt ladet THC-syre (deprotonert syre). Gul graf: negativt ladet THC-syre (deprotonert syre og fenol).

## 3.2 Kjemikalier

Analytt og internstandard, samt kjemikalier som ble benyttet i oppgaven er definert i henholdsvis Tabell 2 og Tabell 3.

**Tabell 2** Analytt og internstandard

Stoffnavn	Beskrivelse	Produsent	By/land
THC-syre	0,1 mg/ml i metanol	Lipomed	Arlesheim, Sveits
	1000 µg/ml i metanol	Chiron AS	Trondheim, Norge
THC-syre D3	100 µg/ml i ml metanol	Chiron AS	Trondheim, Norge

**Tabell 3** Liste over kjemikalier og deres renhet, samt produsent og by/land

Stoffnavn	Renhet	Produsent	By/land
2-nitrofenyloktyleter (NPOE)	≥ 99,0 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Ammoniakk	25 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Ammoniumacetat	≥ 98 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Dimetylsulfoksid (DMSO)	≥ 99,9 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Dodecylacetat	97 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Dodekanol	≥ 99,5 %	Fluka Chemika	Buchs, Sveits
Dinatriumfosfatdihydrat	98,5-101,0 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Ionebyttet vann	MilliQ;Ultrapure type 1	Millipore	Oslo, Norge
Maursyre	~ 98, %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Metanol	100 %, Hypergrade for LC-MS	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Natriumhydroksid (NaOH)	99,3 %	VWR International	Radnor, PA, USA
Nonanol	~ 98 %	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Oktanol	≥ 99,9	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland
Saltsyre (HCl)	37 %	Merck KGaA	Darmstadt, Tyskland
Undekanol	≤ 100%	Sigma-Aldrich	Steinheim, Tyskland

### 3.3 Utstyr

Informasjon om analyseinstrumentene er definert i Tabell 4 og Tabell 5. Utstyr brukt til EME er vist i Tabell 6 og Tabell 7. Pipetteutstyr, diverse utstyr og forbruksmateriell som ble benyttet er definert i henholdsvis Tabell 8, Tabell 9 og Tabell 10.

**Tabell 4** Analyseinstrument ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo (UiO)

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Dataprogram	Xcalibur	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
Kolonne	Acquity UHPLC <sup>®</sup> HSS T3 (100 x 1 mm) 1,8 µm partikler	Waters	Milford, MA, USA
MS/MS	LTQ XL lineær ionefelle	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA
UHPLC	Dionex UltiMate 3000 RS	Thermo Scientific	San Jose, CA, USA

**Tabell 5** Analyseinstrument ved Avdeling for rettsmedisinsk fag på Oslo Universitetssykehus (OUS)

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Dataprogram	MassLynx	Waters	Milford, MA, USA
Forkolonne	Acquity UPLC <sup>®</sup> BEH C-18 (5 x 2,1 mm) 1,7 µm partikler	Waters	Milford, MA, USA
Kolonne	Acquity UPLC <sup>®</sup> BEH C-18 (50 x 2,1 mm) 1,7 µm partikler	Waters	Milford, MA, USA
MS/MS	Xevo TQS	Waters	Milford, MA, USA
UHPLC	Acquity <sup>™</sup> Ultra Performance LC	Waters	Milford, MA, USA

**Tabell 6** Utstyr brukt i forbindelse med EME ved bruk av 96-brønnsplate

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Bunnplate med 96-brønner	Maksimalt volum: 300 µl (7,9 x 6 mm dyp), 100 µl (7,9 x 10 mm dyp)	Instrumentverkstedet Fysisk institutt, Universitetet i Oslo	Oslo, Norge
Elektroder	Strømledninger med krokodilleklemme og bananplugg		
Multimeter	Agilent U1253A	Agilent Technologies	California, USA
Risteapparat	Metrahit X-tra Vibramax 100	Gossen-Metrawatt Heidolph Instruments	Nürn, Tyskland Schwabach, Tyskland
Strømforsyning	ES 0300-0.45	Delta Elektronika B.V.	Zierikzee, Nederland
Topplate med 96 brønner	MultiScreen® Filter plates. MAIPN4550. Porestørrelse 0,45 µm. Hydrofob polyvinylidenfluorid (PVDF)	Merck Milipore	Carrigtwohill, Irland
Topplate med 96 elektroder	Aluminium	Instrumentverkstedet Fysisk institutt, Universitetet i Oslo	Oslo, Norge
Platinatråd Gummipropper	Diameter 0,5 mm. Til festing av platinatråd til topplate	K.A Rasmussen	Hamar, Norge

**Tabell 7** Utstyr brukt i forbindelse med EME med prototype for kommersielt utstyr (heretter kalt kommersielt utstyr)

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Elektroder	Strømledninger med ringformet kobbertråd loddet på		
Prototype for kommersielt utstyr for EME (vial)	EC-5 med union av plastikk	Extraction Technology Norway AS	Ski, Norge
Modifisert Vortex-mixer	Modifisert IKA® Shakers MS 3 basic, pålimt holder for kommersielt utstyr (vial)		

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Multimeter	Agilent U1253A	Agilent Technologies	California, USA
Strømforsyning	Metrahit X-tra ES 0300-0.45	Gossen-Metrawatt Delta Elektronika B.V.	Nürn, Tyskland Zierikzee, Nederland
Polypropylen (PP)	Accurel® Flat Membrane. Til membran for kommersielt utstyr.	3M (Membrana)	Wuppertal, Tyskland

**Tabell 8** Pipetter og pipettespisser

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
BIOHIT pipetter	M20, M200, M1000 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sartorius, Biohit	Göttingen, Tyskland
BIOHIT pipettespiss Sartorius pipetter	5 ml mLINE 20 µl, 5000 µl	Sartorius, Biohit Sartorius	Göttingen, Tyskland Göttingen, Tyskland
Sartorius pipettespisser	Optifit refill tips 200, 350, 1000 µl	Sartorius	Göttingen, Tyskland

**Tabell 9** Diverse utstyr

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Analysevekt	AE200 Analytical Balance	Mettler-Toledo	Greifensee, Sveits
pH-meter	744 pH meter	Metrohm	Herisau, Sveits
Vortex-mikser	IKA® Shakers MS 3 basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG	Staufen, Tyskland

**Tabell 10** Forbruksmateriell

Utstyr	Beskrivelse	Produsent	By, land
Eppendorfrør	1,5 ml, 2 ml, 5 ml	Eppendorf	Hamburg, Tyskland
Innsats til vialer	Micro Insert, 0,1 ml 31x6 mm	VWR International	Radnor, PA, USA
Kork til vialer av glass	9 mm Combination Seal	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge
pH-indikatorpapir	Universalindikator pH 0-14	Merck	Darmstadt, Tyskland
Vialer av glass til autosamplere	1,5 ml Short Thread Vial, 32x11,6 mm	Nerliens Meszansky	Oslo, Norge



## 3.4 Løsninger

### 3.4.1 Buffere

Det ble benyttet ulike buffere for å kontrollere pH i donor- og akseptorløsning. Ettersom analytten som undersøkes i oppgaven er en syre, er det ønskelig at den deprotoneres og får en ladning da det er essensielt for ekstraksjonen. Dermed ble det benyttet basiske buffere i de fleste forsøk. THC-syren vil dermed foreligge på negativt ladet form (Figur 8). Mesteparten av buffere ble laget med pH ~10,2.

#### **Innledende forsøk med ekstraksjon av vandige prøveløsninger:**

##### **200 ml 50 mM ammoniumacetat, pH 10,2**

7708 mg ammoniumacetat ble løst opp i MilliQ-vann og fortynnet til 200 ml. 1 M NaOH ble benyttet for å justere til ønsket pH ~10,2.

##### **100 ml 100 mM ammoniumacetat, pH 10,2**

7708 mg ammoniumacetat ble løst opp i MilliQ-vann og fortynnet til 100 ml. 1 M NaOH ble benyttet for å justere til ønsket pH ~10,2.

##### **100 ml 50 mM ammoniumformat, pH 10,2**

Denne bufferen var tilgjengelig fra OUS.

##### **50 mM fosfatbuffer, pH 11**

890 mg dinatriumfosfatdihydrat ble løst opp i MilliQ-vann og fortynnet til 100 ml.

##### **10 ml 50 mM NaOH, pH 12,5**

500 µl av 1 M NaOH ble fortynnet med MilliQ-vann til 10 ml.

##### **100 ml 1 M NaOH, pH 14**

Denne bufferen var ferdig tillaget 28.01.19 av Marthe Lid.

##### **250 ml 1 M saltsyre, pH 1**

20,7 ml 37% saltsyre ble fortynnet med MilliQ-vann til 250 ml.

#### **Innledende forsøk med ekstraksjon av biologiske prøver og metodevalidering:**

##### **50 ml 10 M NaOH, pH 14**

20 g NaOH ble løst opp i MilliQ-vann og fortynnet til 50 ml.

### **100 ml 10 mM saltsyre, pH 1**

Denne bufferen var ferdig tillaget 11.02.20 av Elisabeth Leere Øiestad.

## **3.4.2 Diverse løsninger**

### **250 ml 1 M ammoniakk i vann**

18,8 ml ammoniakk (25 % renhet) ble tilsatt i en 250 ml kolbe og fortynnet med MilliQ-vann.

### **Organisk væskemembran (SLM)**

- Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)
- Nonanol:undekanol 50:50 (v/v)
- NPOE:nonanol 50:50 (v/v)
- NPOE:undekanol 50:50 (v/v)

### **Dimetylsulfoksid i 50 mM ammoniumacetat**

Ulike blandinger av dimetylsulfoksid (DMSO) og 50 mM ammoniumacetat (pH 10,2) ble laget i forbindelse med innledende forsøk av vandige prøveløsninger med 96-brønnersformat. Blandingene ble laget etter følgende prosentvise sammensetning av DMSO i 50 mM ammoniumacetat (v/v): 25, 40, 50, 60, 70, 75 og 80 %. Det ble også laget en blanding på 30 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat i forbindelse med forsøk for evaluering av akseptorvolum med kommersielt utstyr.

## **3.4.3 Stamløsninger**

Det ble benyttet tre ferdiglagde stamløsninger av THC-syre, hvorav de to første stamløsningen med THC-syre var tilgjengelig ved OUS. Alle stamløsningene bestod av en blanding med metanol og THC-syre. Konsentrasjonene av stamløsningene er definert i Tabell 2.

Stamløsningene ble oppbevart i fryser ved -28 °C.

## **3.4.4 Arbeidsløsninger**

En arbeidsløsning ble tillaget ved å tilsette stamløsning av THC-syre i en 10 ml målekolbe og fortynne med metanol. Konsentrasjonen av arbeidsløsningene med THC-syre var 4,498 µg/ml, 11,2 µg/ml og 100 µg/ml.

Arbeidsløsningene ble oppbevart ved -28 °C.

### 3.4.5 Standarder og kontroller

#### Innledende forsøk med ekstraksjon fra vandige og biologiske prøver

Standarder ble laget på to ulike måter, avhengig av benyttet akseptorløsning. I de innledende forsøkene ble 50 mM ammoniumacetat benyttet som akseptorløsning. Dermed ble standarder tillaget ved å fortynne arbeidsløsning av THC-syre i 50 mM ammoniumacetat til ønsket konsentrasjonsnivå. I de resterende forsøkene ble en såkalt «spikeløsning» tillaget ved å fortynne arbeidsløsning av THC-syre i 50 mM ammoniumacetat før det ble videre fortynnet i akseptorløsning som var sammensatt av DMSO og 50 mM ammoniumacetat til ønsket konsentrasjonsnivå.

#### Metodevalidering

Arbeidsløsninger av THC-syre ble fortynnet med 100 mM ammoniumacetat for tillaging av ulike bruksløsninger. Videre ble bruksløsningene fortynnet til åtte konsentrasjonsnivåer, hvorav fem konsentrasjonsnivåer var til Standard 1-5 og tre konsentrasjonsnivåer var til Kontroll 1-3. Hvilke konsentrasjoner standardene og kontrollene representerte, er definert i henholdsvis Tabell 11 og Tabell 12.

**Tabell 11** Konsentrasjon THC-syre i 100 mM ammoniumacetat for standard brukt til metodevalidering

Standarder	1	2	3	4	5
Konsentrasjon av THC-syre (µg/ml)	100	200	300	750	2000

**Tabell 12** Konsentrasjon av THC-syre i 100 mM ammoniumacetat for kontroll brukt til metodevalidering

Kontroller	Konsentrasjon av THC-syre (µg/ml)
1	150
2	500
3	1500

Alle standardene og QC-prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 5 °C.

### 3.4.6 Prøveløsninger

Det ble laget prøveløsninger hvor arbeidsløsninger ble fortynnet med bufferløsning til ønsket konsentrasjonsnivå. For de fleste innledende forsøk med ekstraksjon av vandige prøver, ble disse prøveløsningene brukt som donorløsning, og ble pipettert direkte i brønnene (96-brønnsformat). Konsentrasjonen av THC-syre i disse prøveløsningene var 0,5 µg/ml.

I enkelte forsøk ble det laget prøveløsninger som videre ble fortynnet i brønnene/vialene med bufferløsning. Bufferløsning benyttet for fortynning av prøveløsninger, ble også benyttet ved tillaging av standarder i forsøkene. Konsentrasjonen av THC-syre i disse prøveløsningene var 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 1,25 µg/ml, 5 µg/ml og 10 µg/ml.

Prøveløsningene ble oppvart i kjøleskap ved 5 °C.

### 3.4.7 Internstandard

Det ble benyttet både arbeidsløsninger og bruksløsninger av deuterium-merket THC-syre som internstandard (THC-syre D3). Arbeidsløsningene hadde følgende konsentrasjoner: 20 µg/ml og 9,5 µg/ml. Begge arbeidsløsningene var fortynnet i metanol. Den første arbeidsløsningen var ferdiglaget og tilgjengelig fra OUS.

For en del av forsøkene, ble det laget bruksløsninger av internstandard da det var nødvendig å gå ned i lave konsentrasjonsområder. Bruksløsningene ble fortynnet med 50 mM ammonium-acetat. For 96-brønnersformat ble bruksløsninger på 0,1 µg/ml og 1 µg/ml laget. For kommersielt utstyr ble det laget bruksløsninger på 0,5 µg/ml.

Arbeidsløsningene av internstandardene ble oppbevart i fryseren ved -28 °C, mens bruksløsningene ble oppbevart i kjøleskap ved 5 °C.

### 3.4.8 Mobilfaser

Det ble benyttet to sett med mobilfaser for analyse av prøver. Ett sett ble tillaget ved UiO, mens det andre settet var tilgjengelig ved OUS.

**UiO**

**Mobilfase A**

20 mM maursyre i MQ vann:metanol 95:5 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml metanol til 950 ml 20 mM maursyre i MilliQ-vann.

#### **Mobilfase B**

Metanol:20 mM maursyre i MQ vann 95:5 (v/v) ble laget ved å tilsette 50 ml 20 mM maursyre i MilliQ-vann til 950 ml metanol.

#### **OUS**

#### **Mobilfase A**

5 mM ammoniumformat, pH = 10,2

#### **Mobilfase B**

Metanol

## **3.5 Instrumentelle betingelser**

Det ble benyttet to ulike UHPLC-MS/MS systemer for å analysere prøvene. De innledende forsøkene, samt optimaliseringsforsøkene ble utført på en UHPLC med lineær ionefelle (LC-ITMS) ved Seksjon for farmasøytisk kjemi ved Farmasøytisk institutt. Evaluering av metoden ble utført på en UHPLC med trippel kvadrupol (LC-QqQ) på Avdeling for rettsmedisinske fag ved OUS.

### **3.5.1 LC-ITMS**

#### **UHPLC-betingelser**

De innledende forsøkene med vandig og biologisk prøveløsning, samt optimaliseringsforsøk av biologiske prøver ble utført ved Farmasøytisk institutt hvor prøvene ble ekstrahert og analysert. Analysene ble utført på et UHPLC-MS/MS instrument (Dionex UltiMate 3000 RS) fra Thermo Scientific (San Jose, CA, USA). Instrumentet er beskrevet i Tabell 4.

Instrumentet hadde følgende betingelser:

Injeksjonsvolum: 5 µl  
Injeksjonsmetode: *Partial loop*  
Vaskeløsning: 50 % metanol i MilliQ-vann  
Kolonnatemperatur: 60 °C

Mobilfase:                   A: 50 mM maursyre i MQ vann:metanol 95:5 (v/v)  
                                  B: metanol:50 mM maursyre i MQ vann 95:5 (v/v)

Mobilfasens gradient er fremstilt i Tabell 13, hvor det ble benyttet gradienteluering. Total analysetid var på syv og et halvt minutt.

**Tabell 13** Sammensetning av mobilfasens gradient (gradienteluering) ved analyse på instrument ved Farmasøytisk institutt

Tid	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	80,00	20,00	0,40
0,50	80,00	20,00	0,40
4,00	0,00	100,00	0,40
6,00	0,00	100,00	0,40
6,10	80,00	20,00	0,40
7,00	80,00	20,00	0,40

### MS/MS-betingelser

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

For ionisering av analytten, samt internstandard, ble det benyttet elektrospray i positiv modus med følgende betingelser:

Spray-spenning (*Spray Voltage*):                   4 kV  
Kapillærspenning (*Capillary Voltage*):       31,5 V  
Kapillærtemperatur:                               350 °C  
Forstøvergass (*Sheath Gas Flow Rate*):       Nitrogen (26 AU)  
Tørkegass (*Aux Gas Flow Rate*):               Nitrogen (5 AU)

MS-betingelser ble optimalisert med hensyn på respons for THC-syre og THC-syre D3, samt fragmentering av forløperionene. MS-parametrene ble optimalisert ved å injisere stoffene direkte inn i MS-instrumentet med en sprøytepumpe, og benytte tune-programmet *Thermo Tune Plus* til å finne optimale fragmenteringsbetingelser, samt kollisjonsenergi som er nødvendig for fragmentering.

Til deteksjon ble *Selected Reaction Monitoring* (SRM) benyttet. Etersom både THC-syre og THC-D3 har svært like egenskaper, og dermed MS-betingelser, ble det kun benyttet ett segment

ettersom stoffene elueres nær hverandre. Det ble gjort to skanninger (*Scan Event*) i dette segmentet, en skanning av THC-syre og en skanning av THC-syre D3. Analytten og internstandardens SRM-overganger og kollisjonsenergi er vist i Tabell 14.

**Tabell 14** SRM-overganger av THC-syre og internstandarden brukt til MS/MS analyse på lineær ionefelle, samt kollisjonsenergi

Segment 1	Analytt	Kollisjonsenergi (eV)	Overgang (m/z)
<i>Scan Event 1</i>	THC-syre	30	345,25 > 327,75
<i>Scan Event 2</i>	THC-syre D3	30	348,28 > 330,69

### 3.5.2 LC-QqQ

#### UHPLC-betingelser

Forsøkene som omfattet metodevalidering med biologiske prøver ble utført ved Farmasøytisk institutt, men ekstraktene fra disse forsøkene ble analysert ved OUS på Acquity™ Ultra Performance LC fra Waters (Milford, MA, USA). Instrumentet er beskrevet i Tabell 5.

Instrumentet hadde følgende betingelser:

Injeksjonsvolum:	7,5 µl
Injeksjonsmetode:	<i>Partial loop with needle overfill</i>
<i>Weak wash:</i>	5 % metanol i MilliQ-vann
<i>Strong wash:</i>	90 % metanol i MilliQ-vann
Vaskeløsning:	30 % metanol i MilliQ-vann
Kolonnetemperatur:	60 °C
Mobilfase:	A: 5 mM ammoniumformatbuffer (pH 10,2) B: Metanol

Mobilfasens gradient er fremstilt i Tabell 15, hvor det ble benyttet gradienteluering. Total analysetid var på fem minutter.

**Tabell 15** Sammensetning av mobilfasens gradient (gradienteluering) ved analyse på instrument ved Avdeling for Rettsmedisinske fag ved OUS

Tid	% A	% B	Flow (ml/min)
0,00	95,00	5,00	0,40
0,15	50,00	50,00	0,40
0,30	30,00	70,00	0,40
2,00	2,00	98,00	0,40
2,40	2,00	98,00	0,40
2,50	95,00	5,00	0,40

### MS/MS-betingelser

Massespektrometrien ble utført på et Xevo TQS instrument fra Waters (Milford, MA, USA), som er en trippel kvadrupol.

For ionisering av analytten, samt internstandard, ble det benyttet elektrospray i positiv modus med følgende betingelser:

Kapillærspenning:	2 kV
Source temperatur:	150 °C
Desolvation temperatur:	500°C
Nebuliser Gas Flow:	7,0 bar
Collision Gas Flow:	0,13 mL/min
Cone Gas Flow:	150 L/t
Collision Cell Pressure:	2,0 * 10 <sup>3</sup> mbar

Til deteksjon ble *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) benyttet. THC-syre og internstandardens MRM-overganger, deres kollisjonsenergi og *Cone Voltage* er vist i Tabell 16. Etersom THC-syre og THC-syre D3 elueres ved omtrent samme tidspunkt, benyttes kun ett tidsvindu.



**Tabell 16** MRM-overganger av THC-syre og internstandard brukt til MS/MS analyse på trippel kvadrupol, samt kollisjonsenergi og *Cone Voltage*

Tidsvindu Starttid: ca. 1,4 minutter Stopptid: ca. 2,4 minutter				
Komponent	Forløperion (Da)	Cone Voltage (V)	Kollisjonsenergi (eV)	Overgang (Da)
THC-syre	345,21	30	20	345,21 > 299,2
			15	345,21 > 327,2
THC-syre D3	348,20	30	20	348,20 > 302,2
			15	348,20 > 330,2

## 3.6 Oppsett av EME-systemet

Det ble benyttet to ulike EME-systemer i denne oppgaven. Innledende forsøk ble utført med et system med 96-brønnersformat og dette dannet grunnlaget for betingelser benyttet i forsøkene med kommersielt utstyr.

### 3.6.1 EME-system med 96-brønnersformat

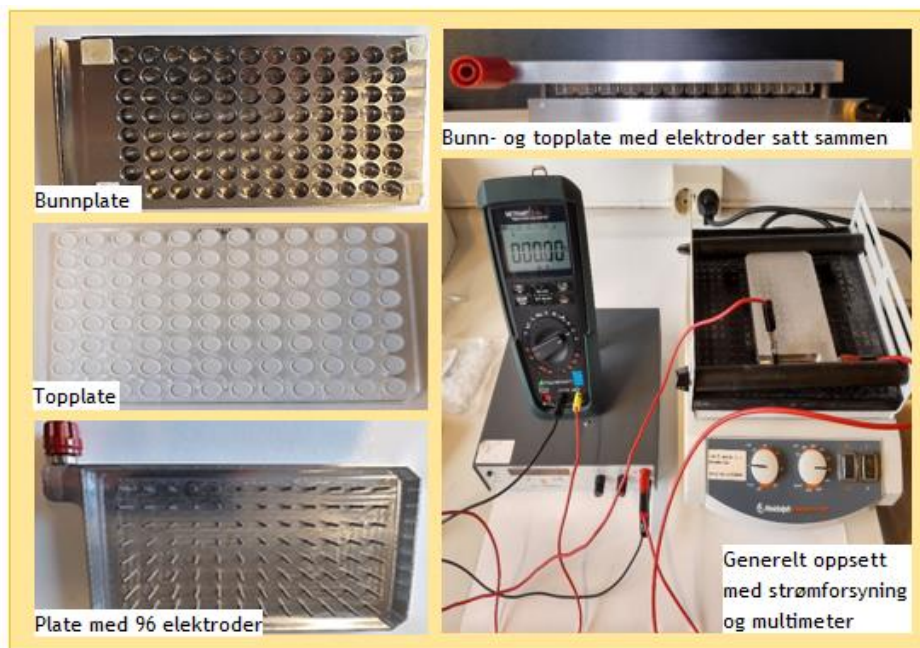
Utstyret som ble brukt, er definert i Tabell 6. Følgende EME-system består av en bunn- og topplate, elektroder som er festet til en strømforsyning koblet til et multimeter og et risteapparat.

Bunnplaten som er av rustfritt stål, består av 96 brønner hvor donorløsning ble tilsatt. Topplaten har tilsvarende 96 brønner, samt filtermembran bestående av et porøst materiale kalt polyvinylidenfluorid (PVDF) som er festet til hver enkel brønn. I disse brønnene ble akseptorløsningen tilsatt og toppelektroder plassert. Plassering av toppelektroder ble utført på to ulike måter: enkel elektrode bestående av platinatråd festet til gummipropp og plate med 96 elektroder festet på. For tillaging av en enkel toppelektrode med platinatråd, ble tråden festet til en gummipropp hvor enden av tråden ble bøyd som en lang «O». Dette ble utført for å unngå perforering av membranen når toppelektroden skulle settes på hver av brønnene i topplaten. Til de innledende forsøkene, ble det førstnevnte benyttet (Figur 9). Etter hvert ble en stålplate med elektroder fremstilt til dette formålet (Figur 10). Denne platen ble benyttet i de resterende forsøkene med 96-brønnersformat ettersom det var mer tidseffektivt; det kan plasseres 96 elektroder på en og samme operasjon sammenlignet med gummipropp-elektroder, hvor proppene settes på en og en om gangen.

Elektroden ble plassert forsiktig på topplaten, før topplaten og bunnplaten ble klemt sammen forsiktig. Dette EME-oppsettet ble deretter plassert på et risteapparat og tilkoblet med ledninger til bunn- og topplate for å opprette en kontakt med en strømforsyning, som videre var koblet til et digitalt multimeter for måling av strøm i systemet. Positiv pol fra strømforsyning ble direkte koblet til toppelektroden, slik at det ble påført positiv potensial til akseptorfasen, mens bunnplaten med prøveløsning ble påført negativ potensial.



**Figur 9** EME-oppsett med 96-brønnersformat hvor gummipropp-elektroder ble benyttet



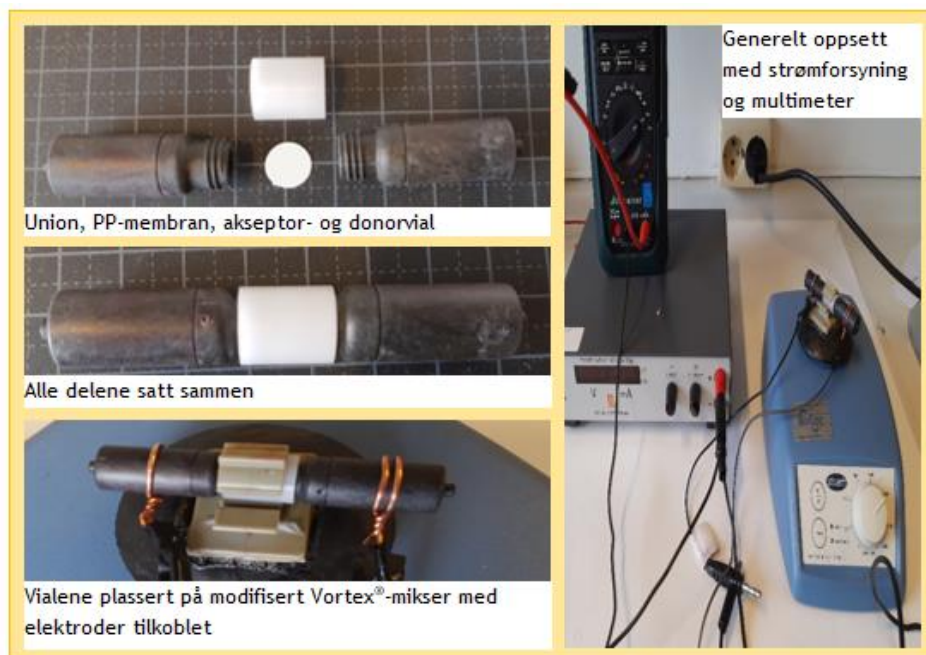
**Figur 10** EME-oppsett med 96-brønnersformat hvor plate med 96 elektroder ble benyttet

### 3.6.2 EME-system med kommersielt utstyr

Oppsettet for EME-systemet med det kommersielle utstyret er illustrert i Figur 11. Utstyret som ble brukt, er definert i Tabell 7. Følgende EME-system består av to vialer, en union med polypropylen (PP) membran, elektroder som er festet til en strømforsyning koblet til et multimeter og et risteapparat.

Prøveløsning og akseptorløsning ble tilsatt i hver sin vial (donor- og akseptorvial), som består av en strømledende polymer. I unionen som koblet sammen vialene og dannet et lukket system, ble en PP-membran plassert. Denne membranen ble laget ved å hulle ut små sirkler fra en rull bestående av PP. Membranen ble plassert på den delen av unionen som skulle være i kontakt med akseptorvialen. Unionen ble skrudd på akseptorvial først, og deretter donorvial for å forhindre at løsningene i vialene skulle lekke. Membranen fungerte som et lokk for akseptorvialen når denne ble skrudd på først, da væsken ikke kunne lekke ut når membranen kom i klem mellom union og akseptorvial.

En modifisert Vortex<sup>®</sup>-mikser ble benyttet som risteapparat for dette EME-systemet. De sammenkoblede vialene ble plassert i holderen på risteapparatet. Til vialene ble elektroder bestående av strømlledning med påloddet ring laget av kobbertråd festet. Ringene ble plassert rundt hver vial. Elektrodene var tilkoblet til strømforsyning og et digitalt multimeter for måling av strøm i systemet. Positiv pol fra strømforsyningen ble direkte koblet til akseptorvial, slik at akseptorløsningen ble påført positivt potensial, mens prøveløsning ble påført negativt potensial.



**Figur 11** De ulike delene i EME-oppsettet med kommersielt utstyr

## 3.7 Utførelse av EME

### 3.7.1 Ekstraksjon fra vandige prøveløsninger

#### 96-brønnersformat

For de innledende forsøkene med ekstraksjon fra vandige prøveløsninger, ble det benyttet to ulike 96-brønnsplater: en dyp og en mindre dyp. Begge platene ble benyttet vekselvis i forsøkene som ble utført, til tross for at den ene platen rommet 300  $\mu\text{l}$  og den andre platen rommet 100  $\mu\text{l}$ . Det skyldes at fremgangsmåten var omtrent den samme, utenom mengde tilsetning av de ulike løsningene.

For 96-brønnsplaten (heretter kalt bunnplate) som rommet 100  $\mu\text{l}$ , ble 100  $\mu\text{l}$  prøveløsning (0,5  $\mu\text{g/ml}$  og 1,25  $\mu\text{g/ml}$  THC-syre) i første omgang tilsatt direkte i brønnene i bunnplaten. Senere ble 50  $\mu\text{l}$  prøveløsning tilsatt i brønnene og deretter fortynnet med 50  $\mu\text{l}$  fortynningsløsning.

For bunnplaten som rommet 300  $\mu\text{l}$ , ble prøveløsning i første omgang tilsatt direkte i brønnene i bunnplaten på 300  $\mu\text{l}$  og deretter 250  $\mu\text{l}$ . Senere ble 50  $\mu\text{l}$  prøveløsning tilsatt i brønnene og deretter fortynnet med 200  $\mu\text{l}$  prøveløsning.

SLM ble dannet ved å tilsette 3 µl organisk løsemiddel til membran på toppplate. Akseptorløsning, bestående av ulike mengder DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat, ble tilsatt i et volum av 100 µl.

Ekstraksjonen ble utført med en ristehastighet på 900 rpm, spenning på 30 til 70 V og varighet mellom 5 og 60 minutter. Ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøk med akseptorløsning, organiske løsemidler som SLM og donorløsning er definert i henholdsvis Tabell 17, Tabell 18 og Tabell 19.

**Tabell 17** Ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøk om akseptorløsning med 96-brønnersplate

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Innledningsvis:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 250 µl prøveløsning (ferdig fortynnet i målekolbe)</li> </ul> </li> <li>• Resterende:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 50 µl prøveløsning</li> <li>○ 200 µl fortynningsløsning:                   <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 50 mM ammoniumacetat</li> <li>▪ 1 M NaOH</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	Totalvolum: 250 µl eller 300 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nonanol</li> </ul>	Volum: 3 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMSO i 50 mM ammoniumacetat               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 25:75 (v/v)</li> <li>○ 40:60 (v/v)</li> <li>○ 50:50 (v/v)</li> <li>○ 60:40 (v/v)</li> <li>○ 70:30 (v/v)</li> <li>○ 75:25 (v/v)</li> <li>○ 80:20 (v/v)</li> </ul> </li> </ul>	Volum: 100 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 6 minutter</li> </ul>	Ristehastighet: 900 rpm Spenning: 50 V Strøm: Justert manuelt < 200 µA

**Tabell 18** Ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøk med organiske væsker som SLM med 96-brønnersplate

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Innledningsvis: 100 µl eller 300 µl prøveløsning (ferdig fortynnet i målekolbe)</li> <li>• Resterende forsøk:</li> <li>• 50 µl prøveløsning</li> <li>• 50 µl eller 200 µl fortynningsløsning (med internstandard i avsluttende forsøk) <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 50 mM ammoniumacetat</li> <li>○ 1 M NaOH</li> <li>○ 1 M HCl</li> <li>○ 100 mM ammoniumacetat</li> <li>○ 1 M ammoniakk i MilliQ-vann</li> </ul> </li> </ul>	Totalvolum: 100 µl, 250 µl eller 300 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dodecylacetat</li> <li>• Nonanol</li> <li>• Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)</li> <li>• Nonanol:undekanol 50:50 (v/v)</li> <li>• NPOE</li> <li>• NPOE:nonanol 50:50 (v/v)</li> <li>• NPOE:undekanol 50:50 (v/v)</li> <li>• Oktanol</li> <li>• Undekanol</li> </ul>	Volum: 3 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Innledningsvis: 50 mM ammoniumacetat</li> <li>• Resterende forsøk: DMSO i 50 mM ammoniumacetat <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 70:30 (v/v)</li> </ul> </li> </ul>	Volum: 100 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 minutter</li> <li>• 15 minutter</li> <li>• 60 minutter</li> </ul>	Ristehastighet: 900 rpm Spennings: 30 V, 40 V, 50 V, 70 V

**Tabell 19** Ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøk med donorløsning med 96-brønnersplate

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 50 µl prøveløsning</li><li>• 200 µl fortynningsløsning (se Tabell 24):<ul style="list-style-type: none"><li>○ 50 mM ammoniumacetat</li><li>○ 50 mM NaOH</li><li>○ 1 M NaOH</li><li>○ 1 M HCl</li><li>○ 50 ammoniumformat</li><li>○ 100 mM ammoniumacetat</li><li>○ 1 M ammoniakk i MilliQ-vann</li></ul></li></ul>	Totalvolum: 250 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Nonanol</li></ul>	Volum: 3 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• DMSO i 50 mM ammoniumacetat<ul style="list-style-type: none"><li>○ 70:30 (v/v)</li></ul></li></ul>	Volum: 100 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• 5 minutter</li><li>• 6 minutter</li><li>• 15 minutter</li><li>• 30 minutter</li></ul>	Ristehastighet: 900 rpm Spenning: 40 V, 60 V Strøm: Justert manuelt til $\leq 200 \mu\text{A}$

### Kommersielt utstyr

Det ble utført optimaliseringsforsøk av akseptorvolum og et såkalt faktorforsøk med det kommersielle utstyret hvor det ble brukt vandig prøveløsning (0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml og 10 µg/ml THC-syre). I de innledende forsøkene, ble 50 µl prøveløsning tilsatt i donorvial og deretter fortynnet med 750 µl 50 mM ammoniumacetat. I faktorforsøket ble prøveløsning på 650 til 1550 µl tilsatt direkte i donorvialene uten videre fortynning. Denne prøveløsningen inneholdt 0,5 µg/ml THC-syre og 0,5 µg/ml internstandard. De ulike ekstraksjonsbetingelsene er definert i Tabell 20 og Tabell 21.

SLM ble dannet ved å tilsette 8 µl nonanol:undekanol 25:75 (v/v) på ferdig uthullet PP-membran som var blitt plassert i unionen. I akseptorvialen ble 400 µl til 800 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat tilsatt.

Ekstraksjonen ble utført med konstant strøm på omtrent 400 µA, med en ristehastighet på mellom 1400 rpm og 2050 rpm. Varigheten på ekstraksjonen var rundt fem minutter og 35 minutter. Strømforsyningen ble manuelt innstilt ved å benytte sølvtråd koblet til hver sin elektrode og tilsatt i et begerglass med 1 M kaliumklorid. Strømmen ble justert forsiktig slik at strømforsyningen ga strøm på omtrent 400 µA. Dette kunne observeres da strømforsyning var koblet til et multimeter. Deretter ble sølvtrådene tatt ut av kaliumklorid-løsningen. Dette var

for å innstille strømforsyningen til maksimalt 150 V. Dermed var det ikke mulig for strømforsyningen å gi mer enn 400  $\mu\text{A}$  strøm, samt ikke overskride 150 V i spenning.

**Tabell 20** Ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon av vandig prøveløsning i innledende forsøk med kommersielt utstyr

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50 <math>\mu\text{l}</math> prøveløsning med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> THC-syre i 50 mM ammoniumacetat (10 <math>\mu\text{g/ml}</math> og 0,2 <math>\mu\text{g/ml}</math> THC-syre benyttet for kalibreringskurve)</li> <li>• 750 <math>\mu\text{l}</math> fortynningsløsning</li> <li>• Innledningsvis: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ DMSO i 50 mM ammoniumacetat 30:70 (v/v)</li> </ul> </li> <li>• Resterende: 50 mM ammoniumacetat med 0,5 <math>\mu\text{g/ml}</math> internstandard</li> </ul>	Totalvolum: 800 $\mu\text{l}$
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)	Volum: 8 $\mu\text{l}$
<b>Akseptorløsning:</b>	DMSO:50 mM ammoniumacetat 70:30 (v/v)	Volum: 400 $\mu\text{l}$ , 600 $\mu\text{l}$ og 800 $\mu\text{l}$
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 minutter</li> <li>• 15 minutter</li> <li>• 30 minutter</li> <li>• 60 minutter</li> </ul>	Ristehastighet: 1400 rpm Konstant strøm $\sim 400 \mu\text{A}$



**Tabell 21** Ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon av vandig prøveløsning i faktorforsøk med kommersielt utstyr

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prøveløsning (ferdig fortynnet i målekolbe med 1 µg/ml THC-syre og 0,5 µg/ml internstandard i 50 mM ammoniumacetat): <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 650 µl</li> <li>○ 800 µl</li> <li>○ 1100 µl</li> <li>○ 1400 µl</li> <li>○ 1550 µl</li> </ul> </li> </ul>	Totalvolum: 650-1550 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)	Volum: 8 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	DMSO:50 mM ammoniumacetat 70:30 (v/v)	Volum: 300 µl, 400 µl, 600 µl og 800 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 minutter</li> <li>• 10 minutter</li> <li>• 20 minutter</li> <li>• 30 minutter</li> <li>• 35 minutter</li> </ul>	Ristehastighet: 550 rpm, 800 rpm, 1300 rpm, 1400 rpm, 1800 rpm, 2050 rpm. Konstant strøm ~400 µA

### 3.7.2 Ekstraksjon fra biologisk prøve

Det var tiltenkt å utføre ekstraksjon av THC-syre fra biologiske prøver som hår og urin med det kommersielle utstyret, men kun urin ble benyttet i denne oppgaven. UiO ble stengt som følge av tiltak for å forhindre spredning og smitte av covid-19. På samme tid ble Avdeling for rettsmedisinske fag ved OUS stengt for eksternt arbeid. Se avsnitt under kapittel 5 for mer informasjon.

I forsøkene gjennomført med urin, ble 450 µl blank urin pipettert til donorvial. Deretter ble følgende løsninger tilsatt i rekkefølge i donorvialen: 50 µl prøveløsning, standard eller kontroll, 25 µl eller 50 µl internstandard, 100 µl 10 M NaOH, 100 µl MilliQ-vann eller 10 M saltsyre, og 100 mM ammoniumacetat ble tilsatt slik at sluttvolumet ble 1250 µl. Det var kun i evalueringsforsøk hvor mengden av internstandard ble redusert til 25 µl. Totalvolumet i donorvial ble 1250 µl.

Blanke prøver med og uten internstandard for evalueringsforsøk, såkalte 0- og 0<sup>+</sup>-prøver, ble laget ved å først tilsette 450 µl urin og 100 µl 10 M NaOH. 0-prøven ble videre tilsatt 700 µl 100 mM ammoniumacetat, mens 0<sup>+</sup>-prøven ble tilsatt 25 µl internstandard og 675 µl 100 mM ammoniumacetat.

SLM ble dannet ved å tilsette 8 µl nonanol:undekanol 25:75 (v/v) på ferdig uthullet PP-membran som er blitt plassert i unionen. I akseptorvialen ble 400 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat tilsatt.

Ekstraksjonen ble utført med en ristehastighet på 1800 rpm med en varighet på 15 og 20 minutter. Tabell 22 og Tabell 23 oppsummerer ekstraksjonsbetingelser benyttet i innledende forsøk og evalueringsforsøk.

**Tabell 22** Ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon av urin i de innledende forsøk

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 450 µl urin</li> <li>• 50 µl prøveløsning med 0,5 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ (10 µg/ml og 0,2 µg/ml THC-syre benyttet for kalibreringskurve)</li> </ul> </li> <li>• 50 µl 9,5 µg/ml internstandard</li> <li>• 100 µl 10 M NaOH</li> <li>• 100 µl 10 M HCl/100 µl MilliQ-vann</li> <li>• 100 mM ammoniumacetat:               <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 300 µl</li> <li>○ 500 µl</li> <li>○ 700 µl</li> </ul> </li> </ul>	Totalvolum: 1050 µl, 1250 µl og 1450 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)	Volum: 8 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	DMSO:50 mM ammoniumacetat 70:30 (v/v)	Volum: 400 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	20 minutter	Ristehastighet: 1800 rpm Konstant strøm ~400 µA

**Tabell 23** Ekstraksjonsbetingelser benyttet ved ekstraksjon av urin i evalueringsforsøk

<b>Donorløsning:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 450 µl urin</li> <li>• 50 µl standard/kontroll (se Tabell 11 og Tabell 12)</li> <li>• 25 µl 1,5 µg/ml internstandard</li> <li>• 100 µl 10 M NaOH</li> <li>• 100 mM ammoniumacetat til totalvolum: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 625 µl</li> <li>○ 675 µl</li> <li>○ 700 µl</li> </ul> </li> </ul>	Totalvolum: 1250 µl
<b>Organisk løsemiddel for SLM:</b>	Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)	Volum: 8 µl
<b>Akseptorløsning:</b>	DMSO:50 mM ammoniumacetat 70:30 (v/v)	Volum: 400 µl
<b>Ekstraksjonstid</b>	20 minutter	Ristehastighet: 1800 rpm Konstant strøm ~400 µA

## 3.8 Forsøksoppsett ved optimalisering av 96-brønnersformat

### 3.8.1 Akseptorløsning

Sammensetning av akseptorløsning ble optimalisert med vandig prøveløsning (0,5 µg/ml og 0,25 µg/ml THC-syre). Følgende prosentvise sammensetning av DMSO i 50 mM ammoniumacetat (v/v) ble testet: 25, 40, 50, 60, 70, 75 og 80 %. Enkelte av forsøkene ble utført samtidig med forsøk om optimalisering av fortynningsløsning for prøveløsning, hvor prøveløsning ble fortynnet direkte i brønnene. Optimal sammensetning av akseptorløsning ble vurdert ved å sammenligne prosesseffektivitet og RSD for signalintensiteten (toppareal) av parallellene for ekstraktene.

### 3.8.2 Organisk løsemiddel til SLM

Ulike organiske løsemidler, samt blandinger av organiske løsemidler ble testet som SLM ved ekstraksjon fra en vandig prøveløsning (0,5 µg/ml og 1,25 µg/ml THC-syre). Både den dype og mindre dype bunnplaten ble benyttet i disse forsøkene. Følgende organiske løsemidler, samt blandinger av organiske løsemidler ble benyttet:

- Dodecylacetat
- Nonanol
- Nonanol:undekanol 25:75 (v/v)
- Nonanol:undekanol 50:50 (v/v)
- NPOE
- NPOE:undekanol 50:50 (v/v)
- NPOE:nonanol 50:50 (v/v)
- Oktanol
- Undekanol

Optimalt organisk løsemiddel som SLM ble vurdert ved å sammenligne prosesseffektivitet og ekstraksjonsutbytte, samt RSD for oppnådd signalintensitet for parallellene av de ulike løsemidlene, samt blandinger av løsemidlene. Toppareal for parallellene ble benyttet i beregning av RSD for signalintensitet.

### 3.8.3 Donorløsning

Ulike løsninger ble testet som fortynningsløsning for THC-syre i de innledende forsøkene, hvorav de fleste var buffere. Senere ble noen av løsningene kombinert for å nøytralisere prøveløsningen. I Tabell 24 er bufferne listet opp, hvorav noen ble brukt i kombinasjon.

**Tabell 24** Løsninger brukt alene eller i kombinasjon som fortynningsløsning (oransje) eller nøytraliseringsløsning (gul) for vandige prøveløsning av THC-syre (1 M NaOH ble benyttet alene i begge typer forsøk)

Løsninger							
50 mM ammonium-acetat	50 mM ammonium-format	50 mM NaOH	1 M NaOH	1 M NaOH	1 M NaOH	1 M NaOH 1 M HCl 100 mM ammonium-acetat	1 M NaOH 1 M ammoniakk i MilliQ-vann

I de innledende forsøk ble prøveløsninger laget ved å fortynne arbeidsløsninger av THC-syre i målekolbe, og pipetterte direkte i brønnene i bunnplaten. I de senere forsøk, særlig da flere løsninger ble benyttet til fortynning av prøveløsning, ble det laget en prøveløsning med litt høyere konsentrasjon enn de innledende forsøkene. Deretter ble 50 µl av prøveløsningene overført til brønnene og fortynnet med løsningene nevnt i Tabell 24. På denne måten ble prøveløsningene fortynnet direkte i brønnene. Optimal fortynningsløsning ble vurdert ved å sammenligne prosesseffektivitet og RSD for signalintensiteten (toppareal) av parallellene for ekstraktene.

## **3.9 Forsøksoppsett ved optimalisering av kommersielt utstyr**

### **3.9.1 Akseptorvolum**

To paralleller av en vandig prøveløsning med THC-syre konsentrasjon på 5 µg/ml ble ekstrahert med kommersielt utstyr med tre ulike volum av akseptorløsning (DMSO:50 mM ammoniumacetat 30:70 (v/v)): 400 µl, 600 µl og 800 µl. Dette ble utført med konstant strøm på omtrent 400 µA i 15 minutter på 1400 rpm. Dette ble testet for å undersøke den minste mengden av akseptorvolum som kan tilsettes og oppnå oppkonsentrering, samt at det opprettholdes et stabilt ekstraksjonssystem (stabil strøm). Minste akseptorvolum som kunne benyttes til ekstraksjon ble vurdert etter prosesseffektivitet ved de ulike akseptorvolumene.

### **3.9.2 Faktorforsøk**

Det ble utført et faktorforsøk for validering av en matematisk modell for ekstraksjon av THC-syre. Programmet Design-Expert versjon 12 ble benyttet for generering av forsøksoppsett [57]. Det kommersielle utstyret ble benyttet og følgende ekstraksjonsparametere ble undersøkt: ekstraksjonstid, risting, donorløsning volum (donorvolum), akseptorvolum. Ekstraksjonsbetingelser er definert i Vedlegg 1, hvor det ble utført 30 forsøk med vandig prøveløsning. Prøveløsningen inneholdt 1 µg/ml THC-syre og 0,5 µg/ml internstandard fortynt i 50 mM ammoniumacetat. Akseptorløsning bestod av 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat og nonanol:undekanol 25:75 (v/v) ble brukt som organisk løsemiddel til SLM. Det ble benyttet konstant strøm, hvor strømforsyningen ble innstilt til omtrent 400 µA. Forsøket ble utført over tre dager, og prosesseffektivitet ble beregnet i forhold til standardkurve. I tillegg ble oppkonsentreringsfaktor undersøkt.

### **3.9.3 Nøytralisering av donorløsning og mengde ammoniumacetat**

Det ble undersøkt om hvilken betydning nøytralisering av donorløsning som inneholdt 10 M NaOH, samt mengde 100 mM ammoniumacetat har å si for prosesseffektivitet. Alle prøvene inneholdt følgende: 450 µl blank urin, 50 µl prøveløsning (10 µg/ml THC-syre), 50 µl internstandard (9,5 µg/ml THC-syre D3) og 100 µl 10 M NaOH. Forsøket bestod av fem prøver med

ulike betingelser, se Tabell 25. Prøvene ble satt i varmeskap på 60 °C i 30 minutter og avkjølt i fryser i 10 minutter før de ble ekstrahert.

**Tabell 25** Testing av nøytralisering av donorløsning og innhold av 100 mM ammoniumacetat

Prøver	1	2	3	4	5
10 M saltsyre	-	100 µl	100 µl	100 µl	-
MilliQ-vann	100 µl	-	-	-	100 µl
100 mM ammoniumacetat	500 µl	300 µl	500 µl	700 µl	300 µl

Det ble beregnet prosesseffektivitet ved å sammenligne responsen av prøvene med responsen av standard. Prøvene med betingelse 1 og 3, og 2 og 5 ble sammenlignet for vurdering av betydning av nøytralisering av den basiske donorløsningen som følge av tilsetning av 10 M NaOH, og mengde ammoniumacetat med bakgrunn i prosesseffektivitet.

### 3.10 Evaluering av metoden

Det ble utført evalueringsforsøk for vurdering av metoden, ettersom det ikke var mulig å gjennomføre full validering. Dette skyldes av mangel på tilstrekkelig med tid for utførelse av forsøkene da UiO var blitt stengt som følge av tiltak for coronaviruset Covid-19. I tillegg er det bare mulig å ekstrahere en prøve av gangen i prototypen av det kommersielle utstyret. Begrepet evaluering bli benyttet fremfor validering, da deler av en full validering ble gjennomført. Det var heller ikke mulig å benytte hår i evalueringen, dermed ble kun urin benyttet.

I evaluering av metoden ble følgende parametere inkludert: linearitet, presisjon og nøyaktighet, minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), ekstraksjonsutbytte, matrikseffekter, og holdbarhet.

Det ble benyttet fire ulike evalueringsserier i forbindelse med evaluering av metoden: serie 1-4. Følgende parametere ble undersøkt i seriene:

- Serie 1: Linearitet og variasjon mellom serie (reproduserbarhet)
- Serie 2: Utbytte og matrikseffekter
- Serie 3: Variasjon innen serie (repeterbarhet)
- Serie 4: Variasjon mellom serie (reproduserbarhet)

Standardene og kontrollene i Tabell 11 og Tabell 12 ble benyttet. Ettersom standardene og kontrollene ble fortynnet 100 ganger i forhold til urinvolum, ble den endelige konsentrasjonen av THC-syre i urinprøvene slik som det er definert i Tabell 26 og Tabell 27. Tabell 23 viser ekstraksjonsbetingelser benyttet i evalueringsforsøkene.

**Tabell 26** Konsentrasjon av THC-syre i urinprøvene tilsatt Standard 1-5 i evalueringsforsøk

Standarder	1	2	3	4	5
Konsentrasjon av THC-syre (ng/ml)	10	20	30	75	200

**Tabell 27** Konsentrasjon av THC-syre i urinprøvene tilsatt Kontroll 1-3 i evalueringsforsøk

Kontroller	Konsentrasjon av THC-syre (ng/ml)
1	15
2	50
3	150

### 3.10.1 Linearitet

Det ble ekstrahert en parallell på fem konsentrasjonsnivå slik som definert i Tabell 26. Linearitetskurvene ble laget ved å plote signalintensiteten for analytten og internstandard mot den teoretiske konsentrasjonen. Det ble utført enkel lineær regresjon for å vurdere kurvens linearitet,  $r^2$ .

### 3.10.2 Presisjon og nøyaktighet

Det ble benyttet tre ulike konsentrasjonsnivåer (Kontroll 1-3) for bestemmelse av presisjon mellom serie (reproduserbarhet). Repeterbarhet ble vurdert ved å beregne gjennomsnittlig relativt standardavvik (RSD) mellom parallellene av Kontroll 2. For reproduserbarhet ble gjennomsnittlig RSD for hvert konsentrasjonsnivå vurdert. Presisjon er dermed angitt som gjennomsnittlig RSD. Standard 1-5 ble også ekstrahert for tillaging av standardkurve til forsøkene.

Nøyaktighet er angitt som prosentavvik fra teoretisk verdi, og ble bestemt samtidig med repeterbarhet og reproduserbarhet.

Grensene for presisjon og nøyaktighet ble satt til å være innenfor  $\pm 20\%$  [58].

### 3.10.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

For bestemmelse av minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK), ble grensene for presisjon og nøyaktighet på  $\pm 20\%$  lagt som grunnlag [58]. Det ble benyttet S/N-forhold (signal-til-støy-forhold) på minst 10.

### 3.10.4 Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet

#### Ekstraksjonsutbytte

Ekstraksjonsutbyttet ble undersøkt på ett konsentrasjonsnivå (Kontroll 2), som dekker det midterste konsentrasjonsnivået i det lineære området for analytten. Ekstraksjonsutbytte ble beregnet etter Matuszewski metode hvor responsen til fem prøver fra forskjellige donorer, med analytt tilsatt før ekstraksjon, ble sammenlignet med responsen til fem prøver fra samme donorer med analytt tilsatt etter ekstraksjon [59]. Ekstraherte prøver som ble tilsatt analytt etter ekstraksjon, skal teoretisk ha samme konsentrasjon av analytt slik som prøver som ekstraheres med analytt, dersom det forutsettes at det oppnås 100 % utbytte. Internstandard ble tilsatt etter ekstraksjon. Signalintensitet (topphøyde) ble benyttet som respons for prøvene. Formelen som ble benyttet for utregning av ekstraksjonsutbytte (R) er vist i Formel 5.

**Formel 5**

$$R = \frac{\text{topphøyde for prøve analytt tilsatt før}}{\text{topphøyde for prøve analytt tilsatt etter}} \times 100\%$$

#### Prosesseffektivitet

I de fleste innledende forsøkene og under optimalisering av ekstraksjonsparametere, ble prosesseffektivitet beregnet fremfor ekstraksjonsutbytte. Ekstraktene ble sammenlignet med standarder nevnt i avsnittet 3.4.5, som hadde konsentrasjon tilsvarende 100 % utbytte. Akseptorløsninger tilsatt spikeløsning av THC-syre ble benyttet som standard i de fleste forsøkene. Formelen som ble benyttet for beregning av prosesseffektivitet (PE), hvor responsen av prøve med tilsatt analytt før ekstraksjon ble sammenlignet med standard er vist i Formel 6.

**Formel 6**

$$PE = \frac{\text{respons for prøve analytt tilsatt før}}{\text{respons for standard}} \times 100\%$$



### 3.10.5 Matrikseffekter

For å undersøke matrikseffekter, ble Matuszewski metode benyttet [59]. Formel 7 ble brukt for beregning av matrikseffekter (ME), hvor arealet av løsning **A** og løsning **B** ble benyttet:

**Formel 7**

$$ME = \frac{B}{A} \times 100 \%$$

**A:** Disse løsningen ble laget ved å tilsette 50 µl Kontroll 2 og 25 µl internstandard til 350 µl akseptorløsning (70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat). 100 µl av løsningene ble overført til vialer med innsats og analysert. Det ble laget fem slike løsninger.

**B:** Det ble benyttet blank urin fra fem ulike donorer til dette forsøket. Disse prøvene ble laget på følgende måte: 450 µl blank urin, 100 µl 10 M NaOH og 700 µl 100 mM ammoniumacetat. Etter ekstraksjon, ble 50 µl Kontroll 2 og 25 µl internstandard tilsatt 350 µl ekstrakt. Dette ble utført på ett konsentrasjonsnivå, som ligger godt innenfor det lineære området for THC-syre. 100 µl akseptorløsning ble overført til vialer med innsats og analysert.

Det ble også beregnet relative matrikseffekter ved å sammenligne ME for urinene med ulike donorer, og dette er angitt som RSD.

### 3.10.6 Holdbarhet

Holdbarheten av ekstraktene ble undersøkt ved å reanalysere en standardrekke og to paralleller av hver kontroll (Kontroll 1-3) etter fire dagers oppbevaring i autosampler ved 10 °C. Konsentrasjon målt i disse ekstraktene ble sammenlignet med opprinnelig oppmålt konsentrasjon, da ekstraktene ble analysert på dag en. Prosentavviket ble beregnet.

## 4 Resultater og diskusjon

Innledningsvis ble ekstraksjonsparametere for metoden optimalisert ved å benytte 96-brønnersplate (se Figur 9 og Figur 10). Da det kommersielle utstyret kun kan ekstrahere én prøve om gangen, ville det ha tatt meget lang tid å utføre et forsøk med flere paralleller og ulike betingelser. Det var derfor mer hensiktsmessig å bruke 96-brønnersplate som tillot ekstraksjoner av flere prøver samtidig.

Det ble utført ekstraksjoner av vandige løsninger i de innledende forsøkene, til tross for at hensikten med oppgaven var å ekstrahere THC-syre fra biologiske prøver. Som nevnt innledningsvis har ikke EME blitt benyttet for ekstraksjon av THC-syre tidligere. Dermed var det gunstig å bruke vandige prøveløsninger av THC-syre for å god forståelse av hvordan stoffet oppførte seg i EME før det ble ekstrahert med kommersielt utstyr.

### 4.1 Optimalisering av ekstraksjonsparametere med 96-brønnersformat

Som nevnt i kapittel 2 utføres EME av syrer med basisk løsning i både donor og akseptor, og SLM bør være et løsemiddel med hydrogenbindingsdonoregenskaper. Tidligere studier har brukt langkjedete alkoholer som SLM [36], og dette ble brukt som utgangspunkt for ekstraksjon av THC-syre. For å optimalisere ekstraksjonen kan innholdet i akseptor, SLM og donor optimaliseres for å få god overgang fra donor til SLM og videre fra SLM til akseptor.

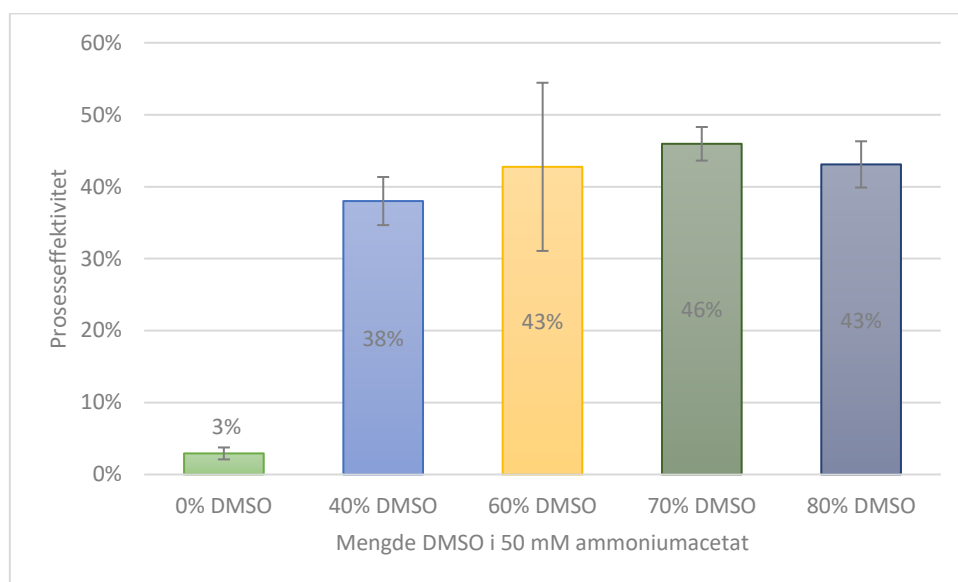
#### 4.1.1 Akseptorløsning

Innledende forsøk med nonanol ga relativt dårlig ekstraksjonsutbytte på omtrent 3 % hvor 50 mM ammoniumacetat ble benyttet som akseptorløsning (Figur 12). THC-syre er en meget upolar syre ( $\log P$  5,2), og kan derfor «fanges» i en upolar SLM. Akseptorløsning ble dermed undersøkt og optimalisert for å forsøke å øke ekstraksjonsutbyttet.

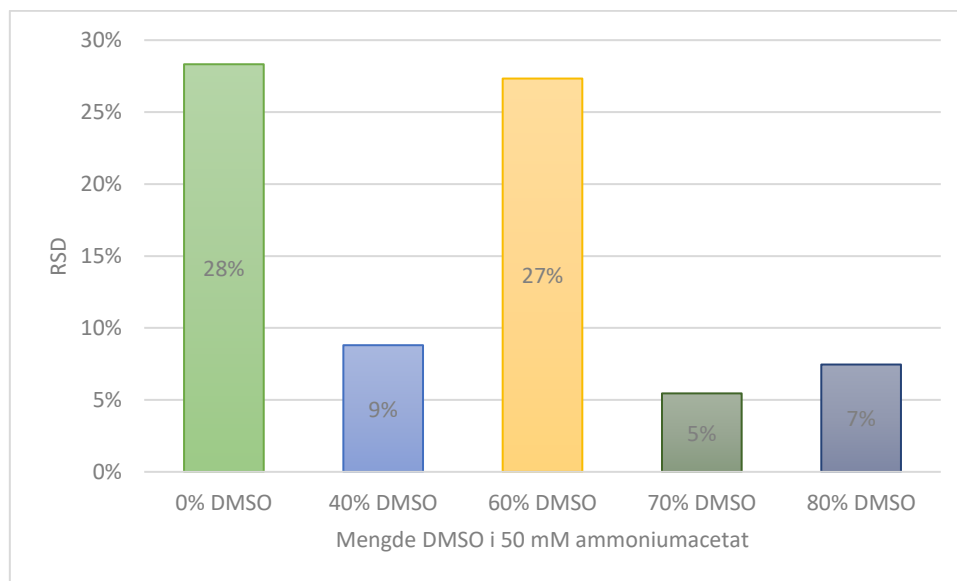
En studie av upolare baser har vist at tilsats av DMSO i akseptorløsning kan øke ekstraksjonsutbyttet [60]. I denne studien ble NPOE benyttet som SLM. Det ble derfor undersøkt om dette kunne gjelde for upolare syrer også, til tross for at nonanol ble benyttet som SLM og ikke NPOE. Dette ble utført ved å tilsette økende mengder av DMSO i akseptorløsning bestående av 50 mM ammoniumacetat, med henholdsvis 40 %, 60 %, 70 % og 80 % DMSO. Tilsetning

av DMSO i akseptorløsning vil gjøre akseptorløsningen mindre polar og vil dermed i teorien gi bedre løselighet av THC-syre, samt økt fordeling fra SLM til akseptorløsning. Gjennomsnittlig prosesseffektivitet og tilhørende RSD for oppnådd signalintensitet ved EME av prøver med ulike mengder DMSO i 50 mM ammoniumacetat er vist i Figur 12 og Figur 13.

Initialt ble 25 %, 50 % og 75 % DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat også forsøkt. Det ga uventet gode resultater sammenlignet med alle gjennomførte forsøk frem til dette punktet. RSD for oppnådd signalintensitet var i tillegg betydelig lavere enn det noen gang hadde vært. Siden det ikke var mulig å reproducere dette forsøket, er resultatene kun lagt ved oppgaven, se Vedlegg 2.



**Figur 12** Gjennomsnittlig prosesseffektivitet i prosent ved modifisering av akseptorløsning med ulike mengder DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat. Prøve: 250  $\mu$ l prøveløsning (0,5  $\mu$ g/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) og 50  $\mu$ l prøveløsning (0,5  $\mu$ g/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) med 200  $\mu$ l 50 mM ammoniumacetat. Akseptor: 100  $\mu$ l 0, 40, 60, 70 og 80 % DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat. SLM: nonanol. Spenning: 50 V og manuell justering av strøm til  $\leq$  200  $\mu$ A. Ekstraksjonstid: 6 minutter. Agitasjon: 900 rpm. n=4.



**Figur 13** RSD for oppnådd signalintensitet (toppareal) i prosent ved tilsetning av ulike mengder DMSO i 50 mM ammoniumacetat, n=4

Prosesseffektivitet som ble oppnådd ved tilsetning av de ulike mengdene av DMSO i 50 mM ammoniumacetat var mellom 38 % til 46 %, med RSD for oppnådd signalintensitet var mellom 5 % og 27 %. Det ble observert en klar økning i prosesseffektivitet ved modifisering av akseptorløsningen ved tilsetning av DMSO, som tenkes å skyldes økt løselighet av THC-syre og dermed større andel av analytten over i akseptorløsning. Det ble oppnådd høyest prosesseffektivitet ved tilsetning av 70 % DMSO i akseptorløsningen (46 %), samt lavest RSD (5 %). Det ble ikke observert en stor forskjell mellom 60 % DMSO og 80 % DMSO sammenlignet med 70 % DMSO, da prosesseffektiviteten oppnådd med disse sammensetningene av akseptorløsning var på 43 %.

80 % DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat ble vurdert som mulig egnet akseptorløsning da oppnådd prosesseffektivitet og RSD var omtrent like stor som ved ekstraksjon med 70 %. Ettersom det ble observert meget variabel og høy strøm i systemet, ble likevel denne sammensetning av DMSO og ammoniumacetat utelatt som mulig kandidat. Det kan tenkes at redusert polaritet i akseptorløsning kan ha medført lekkasje av SLM, da det ble benyttet nonanol, som er relativ upolar løsning, og at dette dermed medført høy og variabel strøm i ekstraksjons-systemet.

Dermed ble 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat vurdert å være den mest egnede akseptorløsningen for EME av THC-syre, og ble benyttet som akseptorløsning i alle resterende forsøk med både 96-brønnersplate og kommersielt utstyr.

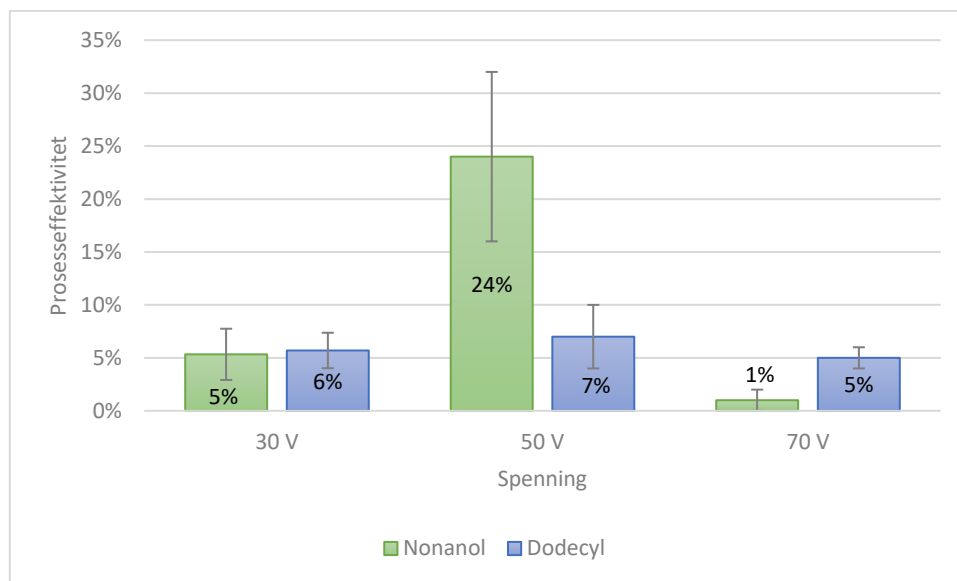
Høy RSD for oppnådd signalintensitet kan skyldes ulike årsaker. Det ble observert ulik strøm ved ekstraksjon med de forskjellige sammensetningene av DMSO og 50 mM ammoniumacetat. Dette kan ha medført at THC-syre ble ekstrahert i forskjellig grad over SLM til akseptorløsning. Det er samtidig ikke uvanlig å observere høy RSD ved lavt utbytte. Høy RSD kan også skyldes at når bunnplate med prøveløsningene ble satt sammen med topp-plate med membraner, ble prøveløsningene skvulpet over i hverandres brønner. Dette kan ha medført at det ble mer prøveløsning i enkelte brønner sammenlignet med andre, slik at det ble observert mer analytt i ekstrahert i noen brønner enn andre brønner. Siden metallplaten og topp-platen ikke produseres av samme leverandør har det også tidligere blitt observert at enkelte batcher har en liten forskjell i størrelse, og kommersialisering av EME-utstyr også i 96-brønnsformat er derfor ønskelig.

Ekstraksjonsbetingelser benyttet i disse forsøkene er oppsummert i Tabell 17.

#### 4.1.2 Organisk løsemiddel til SLM

Tidligere studier av EME av syrer har som nevnt brukt langkjedete alkoholer som SLM [12, 14]. De fleste studier av EME av sure forbindelser har benyttet heptanol, oktanol eller mer langkjedete alkoholer, mens andre organiske løsemidler har vært mindre effektive. Til tross for at det er blitt gjort studier av ekstraksjon av sure forbindelser, er løsemiddelegenskapene som er nødvendig for effektiv masseoverføring av deprotonerte syrer og interaksjoner mellom analytt og løsemidlet, fremdeles ikke fullstendig kartklart og diskutert [12]. Så langt vet man at deprotonerte syrer fungerer som hydrogenbindingsakseptorer, mens løsemiddelmolekylene som danner SLM fungerer som hydrogenbindingsdonorer [36].

Innledningsvis ble nonanol benyttet som SLM for THC-syre, da nonanol er mer upolar enn oktanol og heptanol. De to sistnevnte ble ikke undersøkt da disse alkoholene er mer polare, hvilket kan medføre lekkasje til de vandige prøveløsningene. Dette ville ha skapt et ustabil system med høy strøm. Dodecylacetat ble innledningsvis undersøkt som mulig SLM da det er blitt observert gode ekstraksjonsutbytter for upolare basiske forbindelser ved bruk av en prøveopparbeidelsesmetode kalt *Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction* (PALME), som er en miniatyrisert form for LLE [61]. Resultatene ved bruk av nonanol og dodecylacetat er vist i Figur 14 og Tabell 28.



**Figur 14** Gjennomsnittlig prosesseffektivitet i prosent ved bruk av nonanol og dodecylacetat som SLM. Prøve: 100 µl prøveløsning (0,5 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat). Akseptor: 50 mM ammoniumacetat. SLM: nonanol og dodecylacetat. Spennning: 30 V og 50 V. Ekstraksjonstid: 15 minutter. Agitasjon: 900 rpm. n=8.

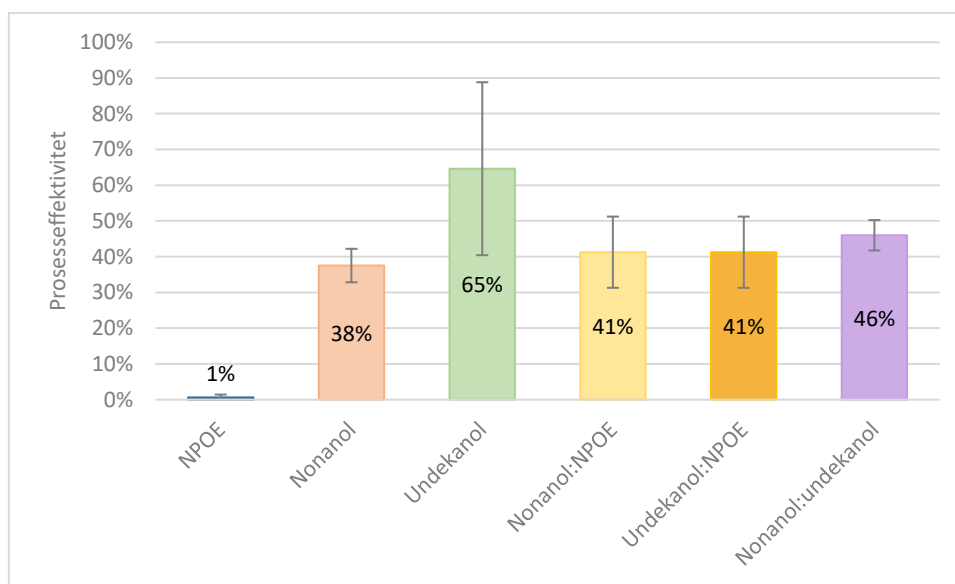
**Tabell 28** Prosentvis mengde av THC-syre i akseptor- og donorløsning, samt deres RSD

Spennning	Nonanol				Dodecylacetat			
	Akseptor	RSD	Donor	RSD	Akseptor	RSD	Donor	RSD
30 V	5 %	45 %	23 %	54 %	6 %	29 %	83 %	6 %
50 V	24 %	32 %	3 %	67 %	7 %	56 %	150 %	43 %
70 V	1 %	123 %	15 %	53 %	5 %	24 %	13 %	51 %

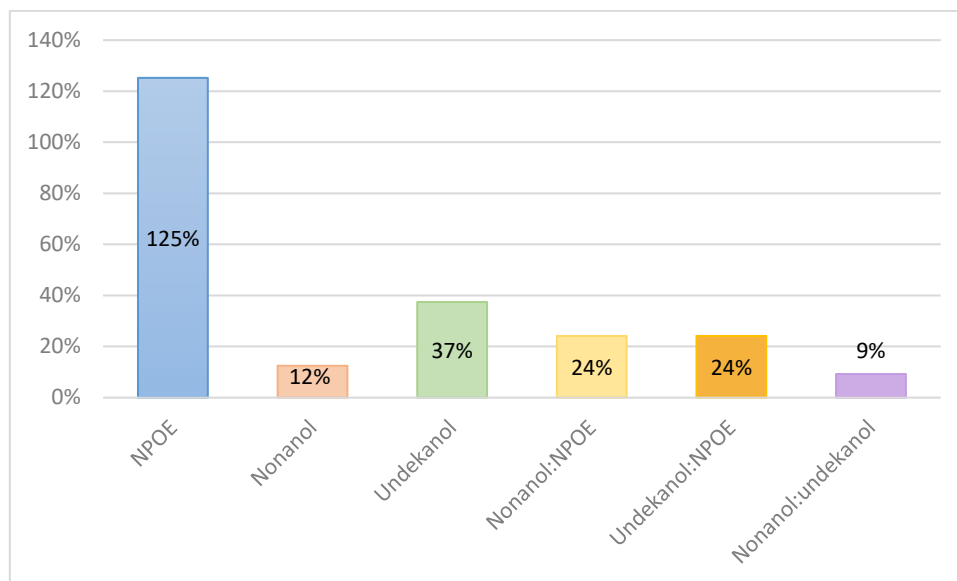
Det ble benyttet ulike spenninger for å sammenligne prosesseffektivitet av nonanol og dodecylacetat. Nonanol ga en del høyere prosesseffektivitet enn dodecylacetat, særlig ved 50 V ble det observert betraktelig høyere prosesseffektivitet (24 %). På den andre siden hadde nonanol en del høyere RSD for oppnådd signalintensitet i forhold til dodecylacetat benyttet som SLM, slik som Tabell 28 viser. Høy RSD kan skyldes skvulp av prøveløsning i nabobrønner da bunn- og toppplate ble satt sammen, slik som nevnt i avsnitt 4.1.1 Ettersom dette var blant de første forsøkene som ble utført, var det i tillegg ikke uvanlig at dette skjedde da teknikken for påsetting av platene måtte innøves. Basert på prosentvis mengde av THC-syre i donor, var det betydelig lavere verdier for nonanol enn dodecylacetat, særlig ved 50 V. Dette viste at mye analytt gikk inn i SLM med nonanol. Dermed ble nonanol benyttet som SLM i de videre forsøk som er beskrevet under avsnittene 3.8.1 og 3.8.3.

For å forsøke å øke ekstraksjonsutbyttet av THC-syre ble en mer langkjedet alkohol, undekanol, testet. Ekstraksjon med NPOE (2-nitrofenyl oktyleter) ble også gjennomført, da det er stor kjennskap til bruken av NPOE som SLM [4, 12, 37, 38]. I første omgang ble NPOE, nonanol, undekanol, nonanol:NPOE 50:50 (v/v) og undekanol:NPOE 50:50 (v/v) undersøkt ved ekstraksjon i 60 minutter med spenning på 40 V. SLM med langkjedete alkoholer har vist å være mindre stabile i forhold til SLM med NPOE [36]. Derfor ble blandinger med NPOE og alkoholene forsøkt da tidligere studier av EME av sure forbindelser ga bedre stabilitet i ekstraksjonssystemet uten at ekstraksjonseffektivitet ble påvirket [12, 62]. Det ble observert relativ lav prosesseffektivitet av disse løsningene, hvorav NPOE og undekanol oppnådde prosesseffektivitet på 10 % mens resterende hadde forholdsvis 0 % eller 3 %. Resultatet for dette forsøket er vedlagt (Vedlegg 3).

Det ble gjennomført et nytt forsøk med de nevnte organiske løsemidlene, i tillegg til nonanol:undekanol 50:50 (v/v), som ga mye høyere prosesseffektivitet til tross for kortere ekstraksjonstid (10 minutter). Resultatene er vist i Figur 15 og Figur 16.



**Figur 15** Prosesseffektivitet i prosent ved bruk av ulike organiske løsemidler som SLM. Sammensetning av alkoholene, samt alkoholene med NPOE var 50:50 (v/v). Prøve: 100 µl prøveløsning (1,25 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat). Akseptor: 100 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3 µl NPOE, nonanol, undekanol, nonanol:NPOE 50:50 (v/v), undekanol:NPOE 50:50 (v/v) og nonanol:undekanol 50:50 (v/v). Spenning: 40 V. Ekstraksjonstid: 10 minutter. Agitasjon:900 rpm. n=4.

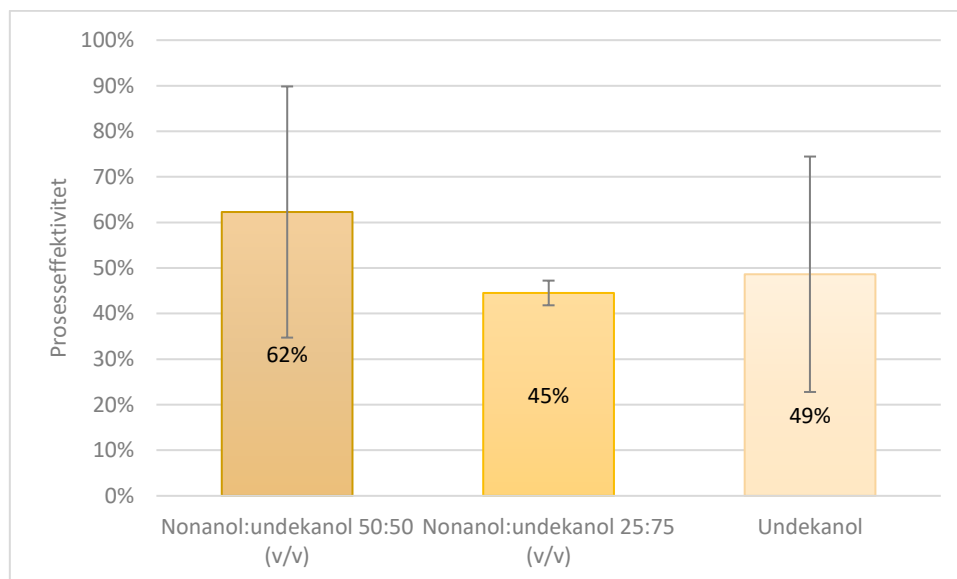


**Figur 16** RSD i prosent ved bruk av ulike organiske løsemidler som SLM, n=4

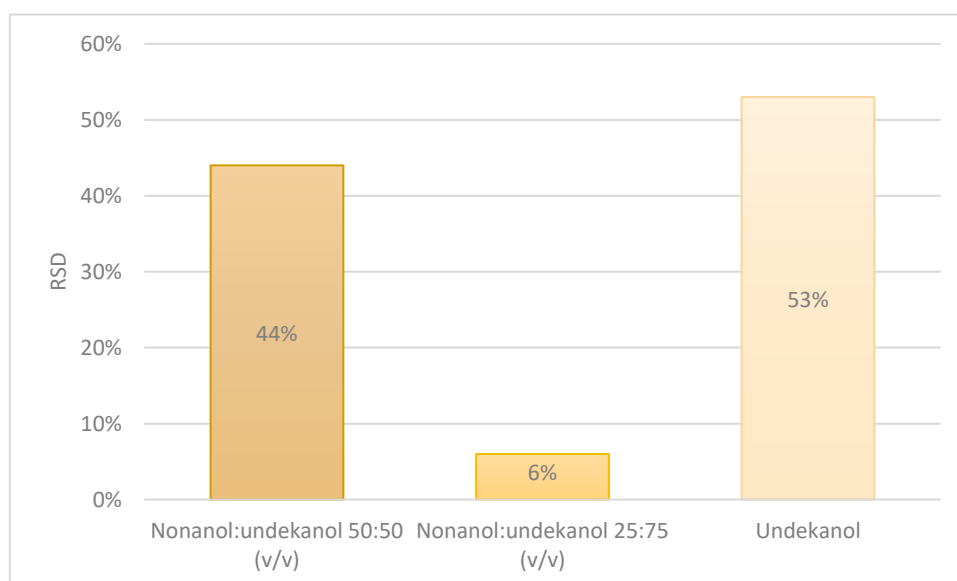
Det ble oppnådd prosesseffektivitet på mellom 1 % og 65 %, i tillegg til varierende RSD (9 - 125 %). Undekanol ga høyest prosesseffektivitet (65 %), etterfulgt av nonanol:undekanol 50:50 (v/v) som ga nest høyest (46 %). Det var ikke forventet å oppnå høy prosesseffektivitet med undekanol, ettersom det var det mest viskøse løsemidlet benyttet i forsøket. Viskøse organiske løsemidler har vist å senke masseoverføring av analytt over SLM som følge av saktere ekstraksjonskinetikk og mindre effektiv interaksjon mellom analytt og løsemiddel, og dermed tar det lengre tid før det oppnås likevekt i systemet [12]. RSD for oppnådd signalintensitet var i tillegg litt høyere enn for ekstraksjoner med nonanol og undekanol kombinert. Lavere RSD ble vurdert som mer gunstig enn høyere prosesseffektivitet, slik at kombinasjonen av nonanol og undekanol ble undersøkt nærmere. Høy RSD generelt kan som nevnt ovenfor, skyldes skvulp av prøveløsning ved sammensetning av bunn- og topplate. Det gikk også variabel strøm i systemet med de ulike organiske løsningene.

Ulike sammensetninger av nonanol tilsatt i undekanol ble undersøkt i forsøk på å finne det optimale organiske løsemidlet som SLM: 50:50 (v/v) og 25:75 (v/v). Det første forsøket som ble utført hadde svært varierende og høy RSD, og resultatet ble dermed ikke inkludert i beregning i forhold til ekstraksjonsutbytte. Dette kan skyldes at ulik mengde prøveløsning ble injisert på instrumentet på UiO, og en såkalt sample-loop ble byttet før analyse av neste forsøk. Resultatene fra det andre forsøket er vist i Figur 17 og Figur 18. Ekstraksjonen varte 10 minutter med 40 V.





**Figur 17** Ekstraksjonsutbytte og RSD i prosent for ekstraksjon med ulike sammensetninger av nonanol og undekanol, samt undekanol alene. Prøve: 50 µl prøveløsning (1,25 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) med 200 µl 50 mM ammoniumacetat. Akseptor: 100 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3 µl nonanol:undekanol 50:50 (v/v), nonanol:undekanol 25:75 (v/v) og undekanol. Spenning: 40 V. Ekstraksjonstid: 10 minutter. Agitasjon: 900 rpm. n=6.



**Figur 18** RSD i prosent for oppnådd signalintensitet (toppareal) ved ekstraksjon av nonanol:undekanol 50:50 (v/v), nonanol:undekanol 25:75 (v/v) og 100 % undekanol. n=6.

Nonanol:undekanol 50:50 (v/v) ga høyest ekstraksjonsutbytte (62 %), men en del høyere RSD (44 %) for oppnådd signalintensitet sammenlignet med nonanol:undekanol 25:75 (v/v) (6 %). Høy RSD kan skyldes årsaker nevnt ovenfor for de andre organiske løsningene. Slik som vurdert ovenfor med de ulike organiske løsemidlene, ble lavere RSD vurdert mer gunstig enn

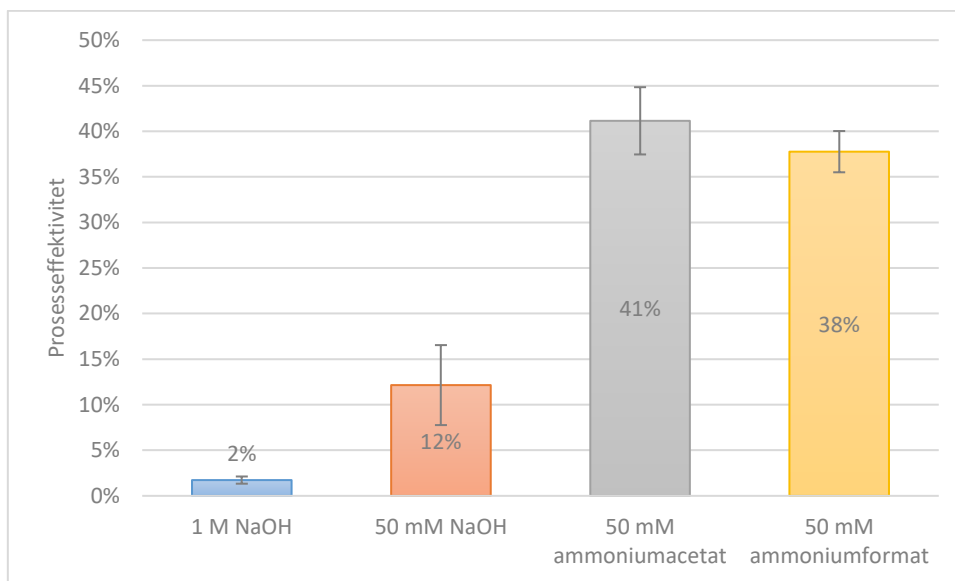
høyere ekstraksjonsutbytte. Dermed ble nonanol:undekanol 25:75 (v/v) vurdert som det mest optimale organiske løsemidlet for SLM, og ble dermed benyttet i forsøk med kommersielt utstyr.

Ekstraksjonsbetingelser benyttet i disse forsøkene er oppsummert i Tabell 18.

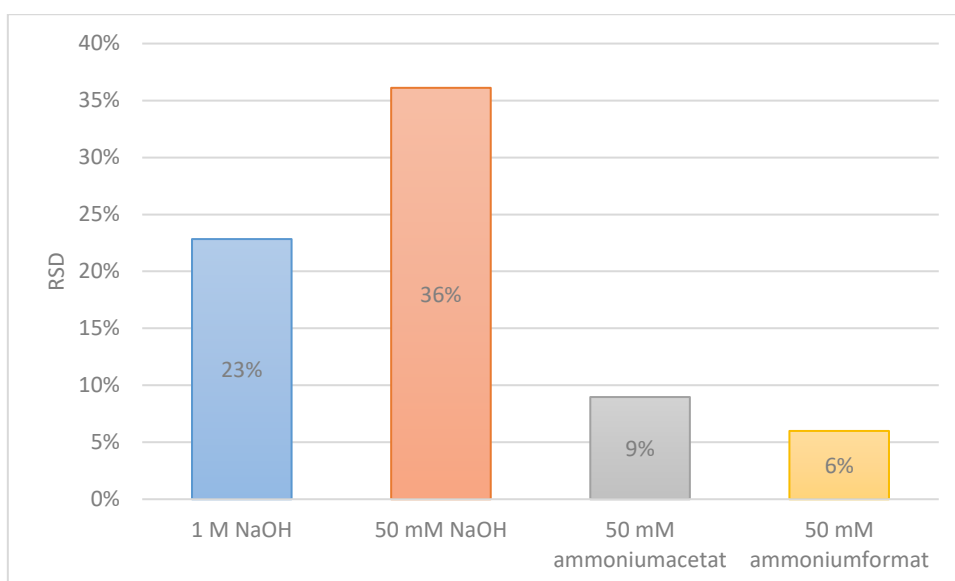
### **4.1.3 Donorløsning**

#### **Fortynningsløsning for prøveløsning**

Ved analyse av THC-syre fra urin eller hår utføres basehydrolyse for å spalte av glukuronidet fra THC-syre (urin) og oppløse håret for frigjøring av THC-syre (hår). Innledningsvis ble 50 mM ammoniumacetat (pH 10,2) benyttet i alle prøveløsninger med THC-syre, men denne bufferen vil ikke være sterk nok til å gi fullstendig hydrolyse. Dermed ble det undersøkt hvilken betydning bruk av sterk base hadde for prosesseffektiviteten med EME av THC-syre. NaOH ble benyttet og det var aktuelt å undersøke om hvordan 1 M NaOH og 50 mM NaOH ville påvirke prosesseffektiviteten. I tillegg ble 50 mM ammoniumacetat og 50 mM ammoniumformat undersøkt da acetatbufferen hadde blitt brukt i alle de innledende forsøk. Bufferne er listet opp i Tabell 24 (oransje kolonner), mens pH for disse bufferne er oppsummert i avsnitt 3.4.1. For akseptorløsning ble 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat benyttet. Dette forsøket ble utført samtidig med forsøk om akseptorløsning i avsnitt 3.8.1. Prøvene ble ekstrahert i seks minutter, og prosesseffektivitet (n = 8) og RSD beregnet ved EME av prøvene er vist i Figur 19 og Figur 20.



**Figur 19** Gjennomsnittlig prosesseffektivitet i prosent ved ulike bufre som fortynningsløsning for THC-syre prøveløsning. Prøve: 50 µl prøveløsning (0,5µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) med 200 µl fortynningsløsning: 1 M NaOH, 50 mM NaOH, 50 mM ammoniumacetat og 50 mM ammoniumformat. Akseptor: 100 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3 µl nonanol. Spenning: Ekstraksjonstid: Agitasjon: 900 rpm. n=8.



**Figur 20** RSD for oppnådd signalintensitet (toppareal) i prosent ved bruk av ulike bufre som fortynningsløsning, n=8

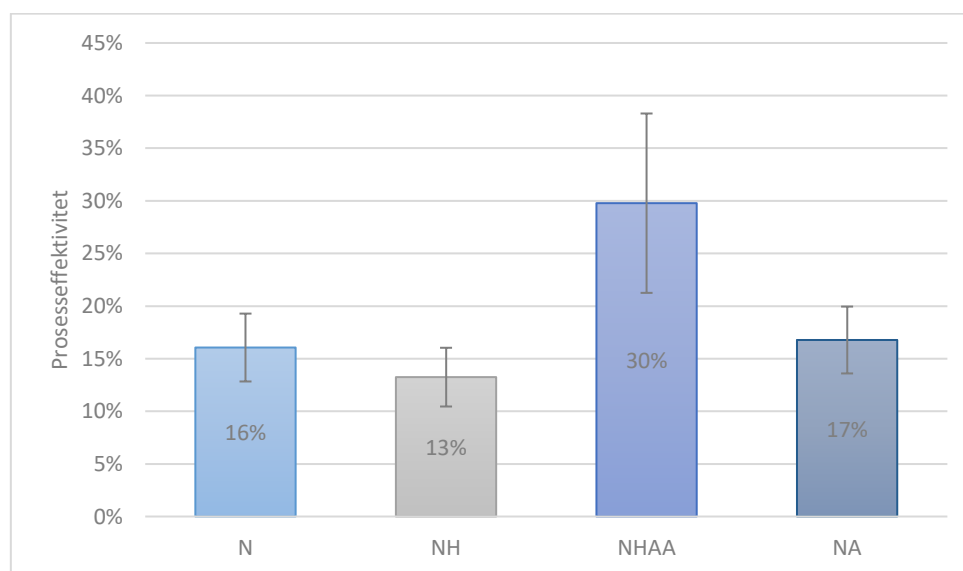
50 mM ammoniumacetat ga høyest prosesseffektivitet på 41 %, med RSD for oppnådd signalintensitet på 9 %. Dette var interessant da det ble oppnådd litt lavere prosesseffektivitet med 50 mM ammoniumformat (38 %), som til felles med ammoniumacetat har ammoniumioner ( $\text{NH}_4^+$ ). Det ble også oppnådd litt lavere RSD med ammoniumformat. I motsetning til de nevnte

bufferne, ble det ikke oppnådd noe særledes høy prosesseffektivitet ved EME av prøver med NaOH, hverken med 1 M eller 50 mM, og disse hadde i tillegg høyeste RSD. En mulig årsak til ulik prosesseffektivitet kan skyldes valg av bakgrunns elektrolytter, som har blitt vist i litteraturen å ha en betydning for resultater i EME-forsøk [63]. I dette forsøket var følgende bakgrunns elektrolytter til stede i donorløsningene:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$  og  $\text{CHO}_2^-$ . Ettersom det ble oppnådd høyest prosesseffektivitet med 50 mM ammoniumacetat, kan det tenkes å skyldes tilstedeværelse av acetationer ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ).

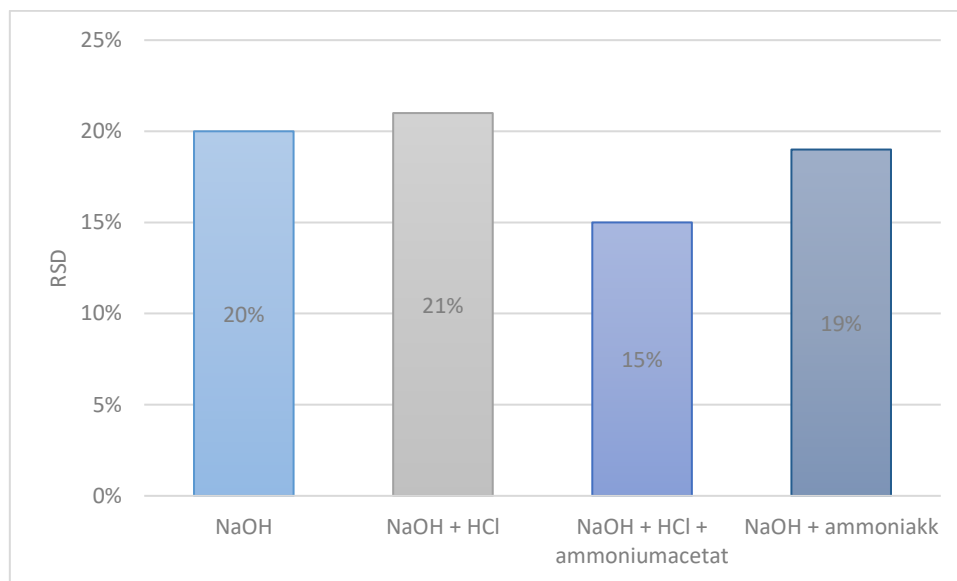
Det ble som nevnt observert høy RSD med disse prøvene, og dermed stor variasjon i mengde THC-syre i ekstraktene. Høy RSD kan skyldes ulike årsaker, slik som nevnt i avsnitt 4.1.1. Det ble observert ustabil og lav strøm i systemet da ekstraksjonene ble gjennomført.

### Nøytralisering av donorløsning

Ulike buffere ble også kombinert med 1 M NaOH og er oppsummert i Tabell 24 (gule kolonner). Det ble utført tre forsøk med ulike ekstraksjonstider: 5, 15 og 30 minutter. Resultater fra forsøket med 15 minutter er blitt inkludert i oppgaven og er vist i Figur 21 og Figur 22. Resultater fra forsøk med 5 og 30 minutter er ikke blitt inkludert som følge av svært sprikende resultater, samt varierende RSD.



**Figur 21** Gjennomsnittlig prosesseffektivitet i prosent ved bruk av ulike løsninger med 1 M NaOH. N: 1 M NaOH, NH: 1 M NaOH + 1 M HCl, NHAA: 1 M NaOH + 1 M HCl + 100 mM ammoniumacetat, NAM: 1 M NaOH + 1 M ammoniakk i MilliQ-vann. Prøve: 50  $\mu\text{l}$  prøveløsning (0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) med 200  $\mu\text{l}$  fortynningsløsning: N, NH, NHAA og NA. Akseptor: 100  $\mu\text{l}$  70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3  $\mu\text{l}$  nonanol. Spenning: Ekstraksjonstid: 15 minutter. Agitasjon: 900 rpm. n=4.



**Figur 22** RSD i prosent for oppnådd signalintensitet (toppareal) ved bruk av ulike løsninger av 1 M NaOH, n=4

Da THC-syre har to sure funksjonelle grupper, både en syre og en fenol, kan THC-syre foreligge i forskjellig ionetilstand avhengig av pH i donorløsning. Figur 8 i avsnitt 3.1 viser at ved pH rundt 6-7 blir syren deprotonert som gir THC-syre en negativ ladning på -1, mens ved pH rundt 12 blir både syren og fenolen deprotonert og gir THC-syre en negativ ladning på -2. Det kan antas at ionetilstanden av THC-syre har en innvirkning på ekstraksjonen og prosesseffektiviteten. Nøytralisering av NaOH (NH) så ikke ut til å øke prosesseffektiviteten noe særlig (13 %), og hadde i tillegg den høyeste verdien for RSD på 21 % sammenlignet med andre løsninger. Nøytralisering av NaOH og tilsats av 100 mM ammoniumacetat (NHAA) ga omtrent dobbelt så høy prosesseffektivitet (30 %) som ekstraksjon fra ren NaOH (N) hvor det ble oppnådd 16 %, og hadde i tillegg lavest RSD for oppnådd signalintensitet av alle løsningene (15 %). Det kan tenkes at høy prosesseffektivitet sammenlignet med alle de andre løsningene kan skyldes tilstedeværelse av acetationer ( $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ), slik som det ble observert i forsøkene ovenfor. Det kan dermed tenkes å oppnå god prosesseffektivitet ved nøytralisering av NaOH med HCl og tilsats av ammoniumacetat, slik at denne betingelsen ble undersøkt nærmere i forsøk med nøytralisering av urin i avsnitt 3.9.3.

pH i donorbrønnene burde ha blitt undersøkt nærmere, da eksakt pH i brønnene var ukjent. Det er viktig å kjenne til pH i disse brønnene da det påvirker ioniseringsgraden av THC-syre. Ettersom pH i bufferne som ble benyttet var høy, var man kun klar over at THC-syre var ladet men ikke graden av ladning. Det er rimelig å anta at pH i løsningene med NaOH og NaOH med  $\text{NH}_3$  er sterkt basiske med pH 12-14. Siden prøveløsningen er i 50 mM ammoniumacetat vil

også pH for blandingen av 1 M NaOH og 1 M HCl være basisk, men trolig lavere enn de andre. For løsningen der det tilsettes 100 mM ammoniumacetat vil man forvente pH rundt 10.

Høy RSD for oppnådd signalintensitet kan skyldes av påsetting av bunn- og topplate, slik som nevnt ovenfor. I tillegg ble det observert varierende strøm med de ulike løsningene.

Ekstraksjonsbetingelser benyttet i de nevnte forsøkene er oppsummert i Tabell 19.

#### **4.1.4 Oppsummering av innledende forsøk med 96-brønnsplate**

Det er mulig å ekstrahere flere prøver samtidig med 96-brønnsplate. Dette er praktisk da det er tidsbesparende, noe som kan være aktuelt ved analyse av biologiske medier som urin. Til tross for at det kan ekstraheres inntil 96 prøver, kan det ikke benyttes store volumer i brønnene. Platene som ble benyttet i oppgaven rommet maksimalt 100 µl og 300 µl. Dette er totalvolumet slik at mengde biologisk prøve vil være lavere når man skal bufre prøven. Siden THC-syre forekommer i lave konsentrasjoner i urin vil det være en fordel å kunne bruke noe større mengder urin, for eksempel 0,5 ml. Deler fra ulike produsenter ble benyttet i oppgaven da kommersielt utstyr for 96-brønnsekstraksjon foreløpig ikke er tilgjengelig, hvilket medførte vanskeligheter ved utførelse av ekstraksjoner. Det ble erfart generelt høy RSD ved ekstraksjon av de vandige prøvene med dette formatet. Ofte kunne det observeres skvulping av løsninger over i andre brønner når bunn- og topplate ble satt sammen. Det kan tenkes at topplaten var litt smalere enn tiltenkt, og på følgende måte kan det ha trengt seg litt ned i bunnplaten og dermed dyttet løsning oppover.

## **4.2 Optimalisering av ekstraksjonsparametere med kommersielt utstyr**

EME er under kommersiell utvikling og et utstyr for EME er på ut i markedet. Utstyret er under utvikling hos et norsk firma kalt Extraction Technology Norway AS, og en prototype av et slik utstyr ble undersøkt i oppgaven (se Figur 11). De betingelsene som ble optimalisert med 96-brønnsplate ble videre benyttet med det kommersielle utstyret, med litt endringer i forhold til volum da det kan benyttes større volumer med opptil 2 ml i hver vial. Det ble også benyttet vandige prøveløsninger av THC-syre for optimalisering av ekstraksjonsparametere. Dette la grunnlag for betingelser benyttet for evaluering av metoden med urin som biologisk matriks.

## 4.2.1 Akseptorvolum

Det er ønskelig å oppnå oppkonsentrering ved bruk av det kommersielle utstyret, da THC-syre ofte foreligger i en lav konsentrasjon i prøver. Det ble vurdert å undersøke 300 µl som akseptorvolum, men et tidligere forsøk ga et meget ustabil system med svært varierende strøm og måtte dermed avbrytes. Derfor ble akseptorvolum på 400 µl, 600 µl og 800 µl undersøkt. Volum tilsatt i donorvial var 800 µl. Dermed var det teoretisk mulig å oppnå en oppkonsentreringsfaktor på henholdsvis 1,33 og 2 for volumene på 600 µl og 400 µl. Prøvene ble ekstrahert i 15 minutter. Resterende ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøket er oppsummert i Tabell 20. Resultatet fra forsøket er vist i Tabell 29.

**Tabell 29** Beregnet prosesseffektivitet, oppkonsentreringsfaktor og RSD for ekstraksjon med ulike akseptorvolum n=2.

Donor- volum	Akseptor- volum	Oppkonsentrerings- faktor	Målt oppkonsentrerings- faktor	Prosess- effektivitet	RSD
800	400	2	1,98	41 %	7 %
800	600	1,33	1,28	40 %	4 %
800	800	1	-	42 %	7 %

Prosesseffektiviteten var omtrent likt ved alle akseptorvolum (40-42 %), og RSD for oppnådd signalintensitet var også lav (4-7 %). Det var forventet høyere prosesseffektivitet basert på forsøket med 96-brønnsoppsettet, men ettersom fortynningsløsningen inneholdt 30 % DMSO, kan det ha medført økt løselighet av THC-syre i donorløsning. Hensikten med tilsetning av DMSO i fortynningsløsning var for å kunne analysere donorløsningene på LC-MS/MS etter ekstraksjon, da det var ønskelig å bestemme hvor mye analytt som ble værende i SLM etter ekstraksjon. I de første utførte forsøkene med kommersielt utstyr ble det observert en del blakkete donorløsninger, og disse var dermed ikke egnet for direkte injisering i væske-kromatografi. Årsaken til at donorløsningen ble blakket etter ekstraksjon var ukjent. Ettersom akseptorløsningen (ekstraktet) ikke var blakket etter ekstraksjon, ble løselighet av SLM mistenkt. Da akseptorløsningen var mer upolar enn donorløsningen, kan det tenkes at det ble dannet mikroemulsjon i donorløsning da SLM kan ha lekket i både akseptor og donor.

Basert på ganske lik prosesseffektivitet samt god RSD, ble 400 µl akseptorvolum bestemt som det laveste volumet som kan benyttet med dette kommersielle utstyret. Med dette volumet er det mulig å oppkonsentrere THC-syre i tillegg til å opprettholde et stabilt ekstraksjonssystem.

## 4.2.2 Faktorforsøk

Faktorbetingelser identifisert i de innledende forsøkene med både 96-brønnersplate og kommersielt utstyr ble benyttet som utgangspunkt for et faktorforsøk, med hensikt å optimalisere betingelsene for ekstraksjon av THC-syre. I dette faktorforsøket ble overflate-respons modell (RSM) benyttet som forsøksoppsett. I tillegg til å muliggjøre optimalisering av faktorene, innebærer bestemmelse av responsoverflaten for hver faktor en ytterligere fordel. Ved å bestemme responsoverflaten kan man få en bedre forståelse av hvordan ekstraksjonssystemet fungerer. Dersom en eller flere faktorer er begrenset (eksempelvis kort ekstraksjonstid) tillater overflateresponsene i tillegg identifisering av endringer ved andre faktorer som gir nye optimale forhold.

For optimalisering av ekstraksjonsbetingelser ble en såkalt fire-faktor *central composite design* (CCD) valgt, som inkluderer faktor-, stjerne- og senterpunkter. CCD består av følgende deler [50]:

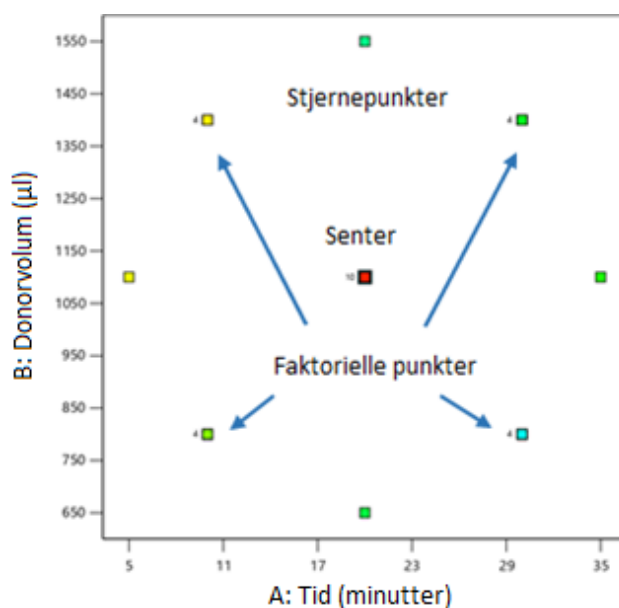
1. Et fullstendig eller redusert faktorforsøk
2. Et ekstra oppsett som ofte er et stjerneoppsett (*star design*) hvor eksperimentelle punkter (stjernepunkter) befinner seg i en avstand fra deres senter. Denne avstanden er betegnet med  $\alpha$  og er ideelt kvadratroten av antall involverte faktorer. Dersom verdien av  $\alpha$  er veldig stor slik at faktorbetingelsene blir upraktiske å gjennomføre, kan en «praktisk»  $\alpha$ -verdi på 1,5 benyttes.
3. Senterpunkter

I dette faktorforsøket ble det valgt å optimalisere ekstraksjonstid (heretter kalt tid), donorvolum, akseptorvolum og risting. Da det forventes økt ekstraksjonsutbytte med økende tid, er dette en naturlig faktor å optimalisere. Det var ønskelig å undersøke både akseptor- og donorvolum sammen med risting da de har betydning for EME. For det første er kontakten mellom væsker og SLM avhengig av alle tre faktorer, og dermed kan utbyttet også være avhengig av dette. For det andre oppnås oppkonsentrering i teorien ved å ha størst mulig forskjell på donor- og



akseptorvolum, men lavere akseptorvolum medfører også dårligere kontakt med SLM. Derfor er lavest akseptorvolum muligens ikke det mest optimale for høy oppkonsentrering.

Det ble benyttet faktorpunkter på lavt og høyt faktornivå (-1 og +1) i dette forsøket. Verdiene for faktornivåene er vist i tabellene i Vedlegg 1, betegnet som «coded low/high». Til tross for estimering av krumning i respons, var ikke stjernepunktene en del av det forventete området. Stjernepunktene  $\alpha$ -verdi ble satt til  $\pm 1,5$ . Senterpunkter ble benyttet til å estimere varians, krumning i respons og undersøke stabilitet i systemet. Punktene er vist i Figur 23.



**Figur 23** Senter med faktorpunkter og stjernepunkter

Det ble utført et fullt faktorforsøk som resulterte i 30 forsøk, og alle faktorene ble undersøkt på fem nivåer. Gjennomsnittet av prosesseffektivitet av replikatene og oppkonsentreringsfaktor ble benyttet som responsfaktorer.

Etter utføring av de 30 forsøkene, ble de oppnådde dataene fra forsøkene analysert med variansanalyse. De aktuelle resultatene fra variansanalysen er vist i Tabell 30 og Tabell 31 for henholdsvis gjennomsnittlig prosesseffektivitet og oppkonsentreringsfaktor, mens forsøkene som ble utført er vedlagt som Vedlegg 1. For analyse av dataene med hensikt på oppkonsentreringsfaktor, ble det utført en naturlig logaritmisk transformasjon av de oppnådde dataene for å tilpasse bedre til den kvadratiske modellen. Vedlegg 4 og Vedlegg 5 viser den fullstendige variansanalysen for begge responsfaktorene.

**Tabell 30** Variansanalyse for kvadratisk modell med gjennomsnittlig prosesseffektivitet som respons

Kilde	F-verdi	P-verdi	Signifikant/ikke signifikant
Modell	36,11	< 0,0001	Signifikant
A-Tid	152,40	< 0,0001	
B-Donorvolum	47,36	< 0,0001	
C-Akseptorvolum	0,1840	0,6725	
D-Risting	17,79	0,0004	
AD	3,44	0,0783	
CD	4,29	0,0514	
B <sup>2</sup>	23,83	< 0,0001	
Residualer			
<i>Lack of fit</i>	2,89	0,1573	Ikke signifikant

**Tabell 31** Variansanalyse for kvadratisk modell med gjennomsnittlig oppkonsentreringsfaktor som respons

Kilde	F-verdi	P-verdi	Signifikant/ikke signifikant
Modell	34,20	< 0,0001	Signifikant
A-Tid	124,31	< 0,0001	
B-Donorvolum	15,67	0,0010	
C-Akseptorvolum	143,77	< 0,0001	
D-Risting	18,74	0,0005	
AB	4,33	0,0530	
AD	6,35	0,0221	
CD	5,10	0,0374	
A <sup>2</sup>	3,16	0,0933	
B <sup>2</sup>	7,06	0,0166	
C <sup>2</sup>	10,36	0,0050	
Residualer			
<i>Lack of fit</i>	3,35	0,1264	Ikke signifikant

Hovedeffektene av tid, donorvolum, akseptorvolum og risting er definert ved henholdsvis A til D i tabellen. AB, AD og CD er effekten av interaksjoner mellom faktorene. Faktorer opphøyd i annen viser at nivået av faktoren ga anledning til en kurvet respons, og at det dermed finnes et optimum.

Tabell 30 og Tabell 31 viser at den resulterende modellen for både prosesseffektivitet og oppkonsentreringsfaktor hadde en p-verdi på  $< 0,0001$ . Dette betyr at modellene for begge responsene er signifikante. Termer ble inkludert i modellene som signifikante hvis p-verdien var mindre enn 0,05. Alternativt ble termer også inkludert hvis p-verdi  $< 0,1$ , og inklusjonen ga anledning til økt forklaringsgrad for modellen (*Lack-of fit* test,  $R^2_{\text{justert}}$  og  $R^2_{\text{predikert}}$ ).

### Prosesseffektivitet

Termene A, B, D, AD, CD og  $B^2$  viste seg å være signifikante for prosesseffektivitet (Tabell 30). Hovedeffekten av akseptorvolum var ikke signifikant da den tilhørende p-verdien var høyere enn 0,05. Ettersom denne faktoren er involvert i en signifikant interaksjon, kan ikke faktoren ekskluderes fra modellen.

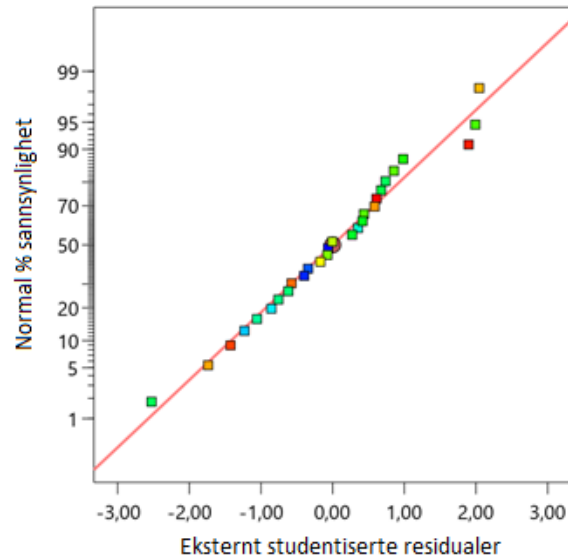
P-verdien for *Lack of Fit* testen beskriver om resulterende modell er egnet for dataene fra forsøkene. P-verdien var på 0,16 og tydet på at *lack of fit* ikke er signifikant i forhold til den sanne feil. Modellen hadde middelshøy verdi for  $R^2_{\text{justert}}$  og  $R^2_{\text{predikert}}$  på henholdsvis 0,90 og 0,84, men sett fra et multivariat DOE perspektiv ble disse  $R^2$ -verdiene ansett som akseptable (Tabell 32). Predikert  $R^2$  beskriver hvor godt en regresjonsmodell kan gi forventende responser for nye observasjoner.

**Tabell 32** Modelltilpasningsstatistikk (*fit statistics*) for variansanalyse av kvadratisk modell for prosesseffektivitet

<b>Standardavvik</b>	8,43	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9267
<b>Gjennomsnitt</b>	80,83	<b>Justert R<sup>2</sup></b>	0,9010
<b>RSD %</b>	10,42	<b>Predikert R<sup>2</sup></b>	0,8435

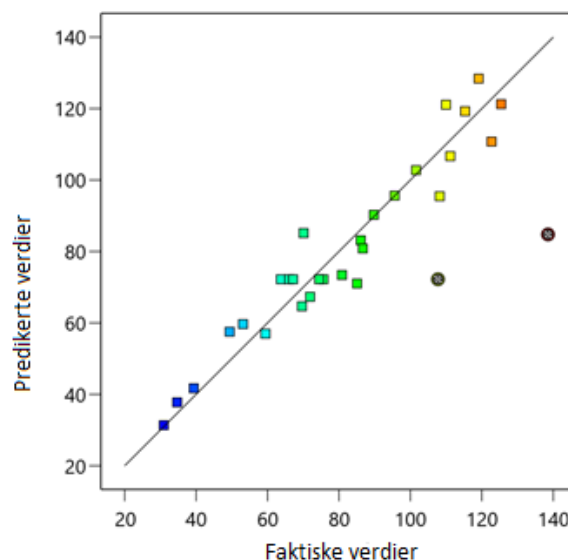
Den predikerte  $R^2$ -verdien var i overensstemmelse med justert  $R^2$ -verdi da forskjellen mellom verdiene var mindre enn 0,2. RSD var omtrent 10,4 % og ble ansett som akseptabel da det er vanlig å akseptere RSD på 10 % når det utføres EME.

Et normalplott av residualer ble også benyttet for videre undersøkelse om egnethet av modellen. Figur 24 viser at residualene var normalfordelt ved at punktene ligger jevnt fordelt langs diagonalen, som er nødvendig for at modellen skal være egnet.



**Figur 24** Normalplott av residualer i forhold til gjennomsnittet av prosesseffektivitet (rett, rød linje)

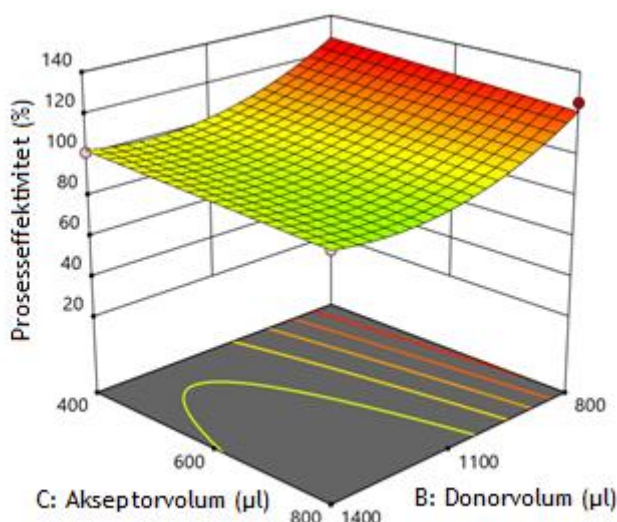
For videre visualisering av modellen ble det laget et plott av predikerte verdier mot faktiske verdier. Figur 25 viser jevn fordeling av punkter rundt diagonalen og indikerer god korrelasjon mellom predikerte og observerte responser. Dette belyser ytterligere at modellen passer for optimalisering av ekstraksjonsbetingelser med hensikt på prosesseffektivitet.



**Figur 25** Sammenligning av faktiske verdier og predikerte verdier av RSM modell for prosesseffektivitet. To punkter ble vurdert som uteliggere og er derfor ikke inkludert i datatolkningen (sorte punkter).

RSM-forsøkene resulterte i en modell som beskriver en respons som en funksjon av de involverte faktorene og nivåene deres. Responsen av hovedeffekter og ulike parametere er vist i figurene nedenfor, som alle er overflateplott.

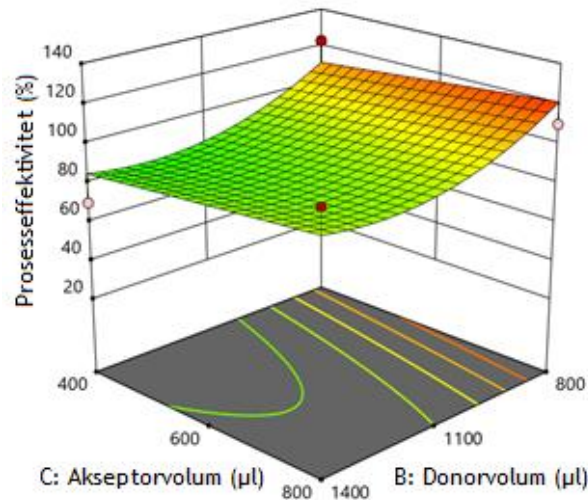
Figur 26 viser overflaten av akseptor- og donorvolum ved maksimal risting (1800 rpm) og tid (30 minutter). Det kan observeres betydelig endring i prosesseffektivitet ved å endre donorvolum. I motsetning til akseptorvolum har donorvolum en større innvirkning på prosesseffektivitet ved maksimal tid og risting. Med andre ord ble det observert høyest prosesseffektivitet ved 800  $\mu\text{l}$  som donorvolum, som er gjenspeilt av det røde området på figuren. Det er fornuftig at det oppnås høyere prosesseffektivitet ved lavere donorvolum da det er mindre stoffmengde (THC-syre) å ekstrahere.



**Figur 26** Respons-overflateplott i 3D med gjennomsnitt prosesseffektivitet (%) som funksjon av akseptor- og donorvolum ved maksimal tid (30 minutter) og risting (1800 rpm)

Det kan forventes lav prosesseffektivitet ved minimum tid og risting da disse begge utgjør viktige faktorer i forbindelse med prosesseffektivitet, som kan observeres som mørkeblå område i plottet (omtrent 30 %). Dette plottet er vedlagt som Vedlegg 6.

Interaksjon mellom akseptorvolum og risting ble som nevnt vist å være signifikant. Ved lav risting og maksimal tid kan det fra Figur 27 observeres lavere prosesseffektivitet sammenlignet med Figur 26. I figuren vises lavere oppnådd prosesseffektivitet som det grønne området i plottet. Det kan observeres at det oppnås lavere prosesseffektivitet ved lav akseptorvolum. Det kan tenkes at det blir dårligere kontakt mellom væske og SLM, som vil resultere i dårligere ekstraksjon av THC-syre over SLM.



**Figur 27** Respons-overflateplott i 3D med gjennomsnitt prosesseffektivitet (%) som funksjon av akseptor- og donorvolum ved maksimal tid (30 minutter) og minimal risting (800 rpm).

Det ble observert prosesseffektivitet  $> 100\%$  som i teorien ikke er mulig å oppnå. Dette tyder på at det er noe feil i systemet. Det er usikkert på hva feilen kan skyldes. Det kan tenkes at feilen kan delvis komme av kalibreringskurven da denne ikke var helt lineær, som kan tenkes å skyldes av overmetning av detektoren. Dette kan ha medført at standarder som ble målt i det øvre konsentrasjonsområdet ble for lave, slik at beregnet prosesseffektivitet ble høy. Instrumentvariasjon kan også være en mulig feilkilde, for eksempel ved injeksjon av ekstraktet eller ved deteksjon av THC-syre i MS. Det kunne ha blitt vurdert å tilsette internstandard etter ekstraksjon som kan korrigere for variasjoner i LC-MS-systemet. Vedlegg 7 viser prosesseffektiviteten oppnådd i alle 30 forsøk.

### Oppkonsentreringsfaktor

Termene A, B, C, D, AB, AD, CD,  $A^2$ ,  $B^2$  og  $C^2$  viste seg å være signifikante for oppkonsentreringsfaktor (Tabell 31). I motsetning til prosesseffektivitet, ble det observert signifikante interaksjoner mellom tid og donorvolum (AB) i tillegg til tid og risting (AD), og akseptorvolum og risting (CD).

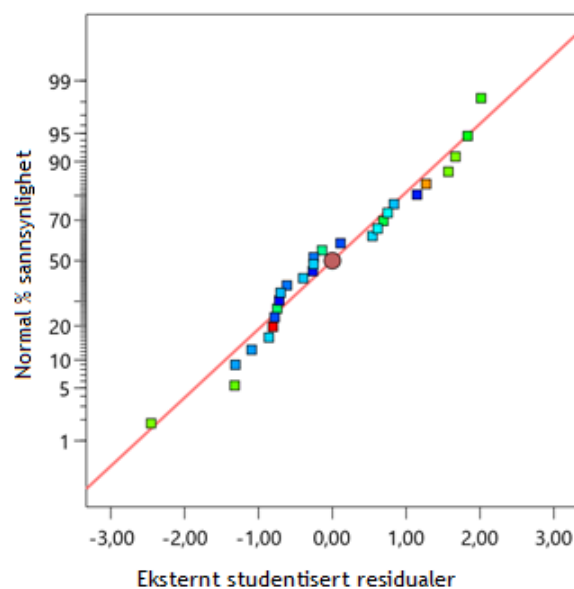
P-verdien for *lack of fit* testen var på 0,13 og tydet på at *lack of fit* ikke er signifikant i forhold til den sanne feil. På samme måte som modelltilpasningsstatistikk oppnådd for modell for prosesseffektivitet, hadde denne modellen middelshøy verdi for  $R^2_{\text{justert}}$  og  $R^2_{\text{predikert}}$  og ble også ansett som akseptable verdier. Disse verdiene er vist i Tabell 33.

**Tabell 33** Modelltilpasningsstatistikk for variansanalyse av kvadratisk modell for oppkonsentreringsfaktor

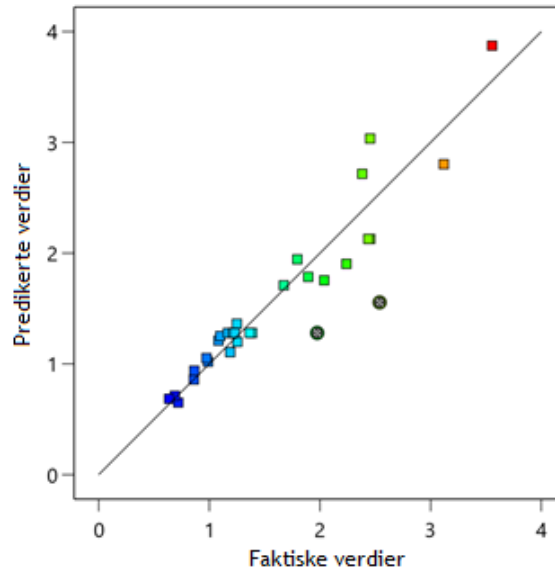
<b>Standardavvik</b>	0,1272	<b>R<sup>2</sup></b>	0,9526
<b>Gjennomsnitt</b>	0,3470	<b>Justert R<sup>2</sup></b>	0,9248
<b>RSD %</b>	36,66	<b>Predikert R<sup>2</sup></b>	0,8497

Forskjellen mellom den predikerte R<sup>2</sup>-verdien og justert R<sup>2</sup>-verdi var mindre enn 0,2, som tyder på at disse R<sup>2</sup>-verdiene er i overensstemmelse. I denne modellen var S/N-forholdet større enn fire og indikerte tilstrekkelig signal. Dette betyr at følgende modell kan benyttes til å navigere i oppsettsområdet (*design space*) for oppkonsentreringsfaktor.

Et normalplott av residualer, og plott for predikerte verdier og faktiske verdier ble også benyttet for videre undersøkelse om egnethet av modellen. Figur 28 viser at residualene ligger langs diagonalen, som tyder på at residualene var normalfordelte. Det ble også observert god korrelasjon mellom predikerte og observerte responser da punktene i plottet er jevnt fordelt langs diagonalen (Figur 29). Begge disse plottene bekrefter ytterligere egnethet av modellen for optimalisering av ekstraksjonsbetingelser med tanken på oppkonsentrering.



**Figur 28** Normalplott av residualer i forhold til gjennomsnittet av oppkonsentreringsfaktor (rett, rød linje)

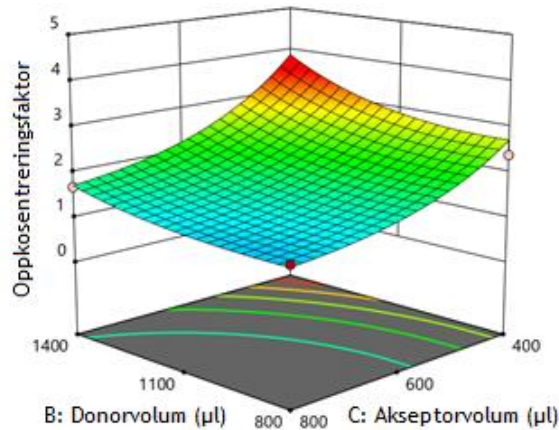


**Figur 29** Sammenligning av faktiske verdier og predikerte verdier av RSM modell for oppkonsentreringsfaktor. To punkter ble vurdert som uteliggere og ble derfor ikke inkludert i datatolkning (sorte punkter).

Da oppkonsentreringsfaktor var den andre responsen som ble undersøkt i disse RSM-forsøkene, resulterte forsøkene også i en modell som beskriver responsen som en funksjon av faktorene og faktornivåene. Responsen er representert i overflateplotter.

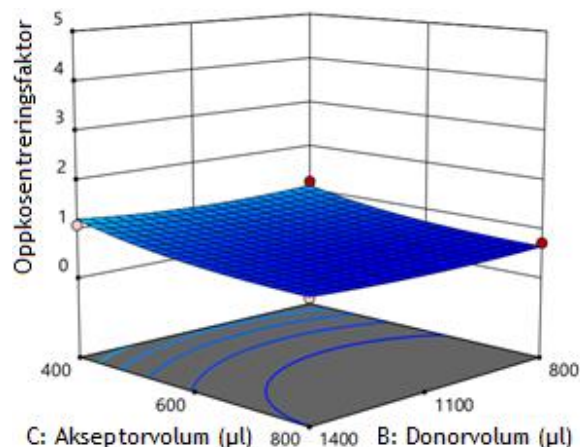
Som nevnt viste alle hovedeffektene av faktorene seg å være signifikante for oppkonsentreringsfaktor. Figur 30 viser overflaten av akseptor- og donorvolum ved 30 minutter og 1800 rpm som var de maksimale faktornivåene benyttet i forsøkene. Det ble observert økende oppkonsentreringsfaktor ved lavt akseptorvolum og høyt donorvolum, slik som forventet. I figuren vises dette ved fargeendring fra mørkeblå til rød, hvor blå er lav oppkonsentreringsfaktor og rød er høy oppkonsentreringsfaktor. Høyeste oppkonsentreringsfaktor ble oppnådd ved ekstraksjon med 1400  $\mu\text{l}$  som donorvolum og 400  $\mu\text{l}$  akseptorvolum. Teoretisk ville dette ha gitt en oppkonsentreringsfaktor på 3,5, som passer godt med oppnådd verdi på 3,56.



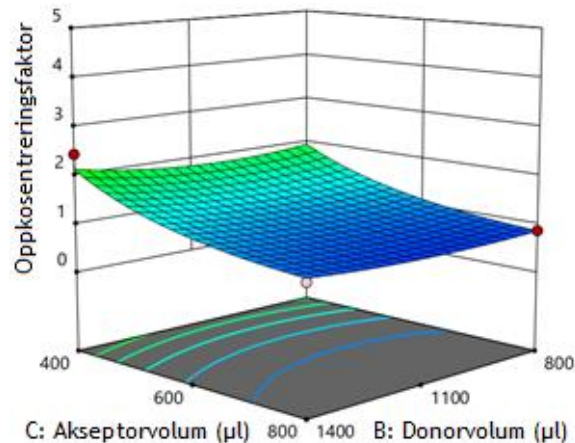


**Figur 30** Respons-overflateplott i 3D med oppkonsentreringsfaktor som funksjon av akseptor- og donorvolum ved maksimal tid (30 minutter) og risting (1800 rpm)

Ettersom tid og risting utgjør viktige faktorer i forbindelse med oppkonsentrering, som vist i Figur 30, kan det forventes å oppnå lav eller ingen oppkonsentrering ved minimum tid og risting. Dette kan observeres i Figur 31 hvor det mørke området i plottet indikerer oppkonsentreringsfaktor under en. Teoretisk skal akseptor- og donorvolum på 800  $\mu\text{l}$  gi oppkonsentreringsfaktor på en. Fra figuren ga følgende volum en oppkonsentreringsfaktor under en. Som nevnt innledningsvis viste den resulterende modellen i tillegg at effekten av interaksjonen mellom tid og risting er signifikant ( $p\text{-verdi} < 0,05$ ). Fra Figur 32 kan det observeres en liten økning i oppkonsentreringsfaktor sammenlignet med Figur 31, ved at det blir benyttet maksimal risting (1800 rpm).



**Figur 31** Respons-overflateplott i 3D med oppkonsentreringsfaktor som funksjon av akseptor- og donorvolum ved minimal tid (10 minutter) og risting (800 rpm)



**Figur 32** Respons-overflateplott i 3D med oppkonsentreringsfaktor som funksjon av akseptor- og donorvolum ved minimal tid (10 minutter) og maksimal (1800 rpm)

Det tyder på at det eksisterer feil i systemet da det ble observert oppkonsentreringsfaktor som ikke stemmer overens med teoretisk beregnet oppkonsentreringsfaktor. Som nevnt for prosesseffektivitet er eksakt feil i systemet ikke kjent. Det kan skyldes av mange ulike årsaker og en potensiell årsak kan tenkes å skyldes av pipetteringsfeil. Dette kan ha medført upresist volum enn det som var forventet. Det kan dermed være ha vært mulig å oppnå litt høyere oppkonsentreringsfaktor enn det som er teoretisk mulig. En annen mulighet kan være variasjoner fra analyseinstrumentet slik som nevnt ovenfor for prosesseffektivitet. Resultatene fra dette forsøket er vedlagt (Vedlegg 7).

Etter etablering av respons-overflatemodellen, var det mulig å navigere gjennom oppsettsområdet. Det var dermed mulig å forutsi nye data av prosesseffektivitet og oppkonsentrering basert på forsøksbetingelser. Gjennom en programvare kan man skissere optimale verdier for de fire faktorene, hvilket er praktisk dersom det er ønskelig å planlegge et forsøk med ønsket respons (eller responser). Dette er også praktisk da programvaren kan undersøke hvordan responsen eller responsene kan forventes å bli ved ulike faktorbetingelser. Dersom det hadde vært tilstrekkelig med tid, hadde det blitt utført forsøk med optimale betingelser for å oppnå høyest prosesseffektivitet og eventuelt høy oppkonsentrering. Det hadde vært interessant å undersøke denne modellen videre.

### **Kommentarer til forsøket**

Spenning (strøm) var ikke en del av de involverte faktorene i faktorforsøket. I de innledende forsøkene ble ulike spenninger benyttet hvor det ble observert mye variabel strøm i systemet. Dermed var det ønskelig å benytte konstant strøm i stedet for konstant spenning med hensikt å

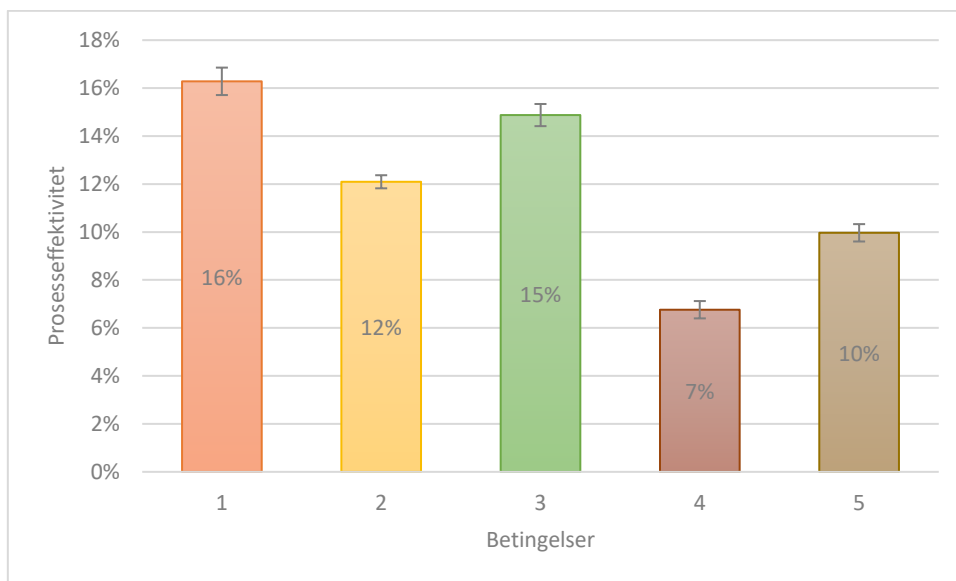
gjøre forsøkene reproducerbare med tanken på strøm. Det ble benyttet konstant strøm på omtrent 400  $\mu\text{A}$  for de innledende forsøkene med kommersielt utstyr, og dermed ble 400  $\mu\text{A}$  benyttet i dette forsøket samt resterende forsøk med utstyret. Dette skyldes av at det ble observert et ganske stabilt system, samt oppnådd prosesseffektivitet og ekstraksjonsutbytte var relativt stabilt. Til tross for at det ble observert et stabilt system med benyttet strøm, burde strømmen ha blitt undersøkt nærmere da det er usikkert om strømmen var optimal for ekstraksjon av THC-syre. Det hadde vært interessant å undersøke om det var mulig å oppnå bedre prosesseffektivitet ved å benytte en annen verdi for konstant strøm.

Det ble ikke undersøkt maksimale verdier for de fire involverte faktorene i dette faktorforsøket, med andre ord er det ikke blitt undersøkt maksimum/minimum faktornivå i forhold til prosesseffektivitet og oppkonsentreringsfaktor. Ettersom det var blitt observert gnist og veldig ustabil strøm i systemet da det ble forsøkt å benytte akseptorvolum lavere enn 400  $\mu\text{l}$ , ble det bestemt å ikke utføre følgende ekstreme verdier for faktorene. Lavere akseptorvolum vil i tillegg resultere i ingen ekstraksjon da det vil være dårlig kontakt mellom løsning og SLM.

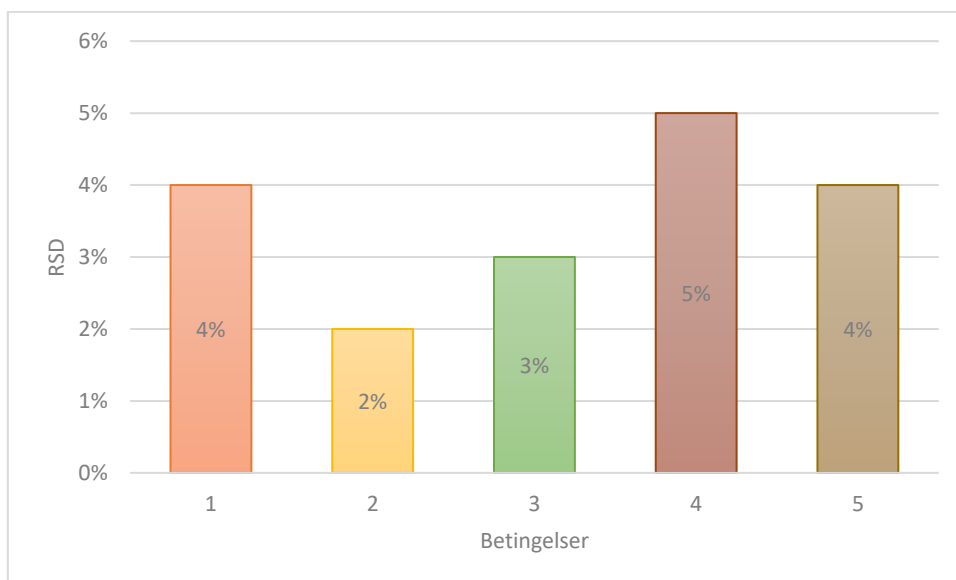
### **4.2.3 Nøytralisering av donorløsning og mengde ammoniumacetat**

På rutinelaboratoriet ved OUS inngår basehydrolyse som et av trinnene ved prøveoppbehandling for isolering av THC-syre i urinprøver. Det blir tilsatt 10 M kaliumhydroksid (KOH) for å spalte av glukuronidet fra THC-syre, ettersom syren foreligger for det meste i glukuronidert form i urin [22]. Deretter blir urinprøven surgjort ved tilsetning av konsentrert eddiksyre. Dette er nødvendig for å få THC-syre på nøytral form før det gjøres en prøveoppbehandling.

KOH var ikke tilgjengelig på laboratoriet ved UiO, dermed ble 10 M natriumhydroksid (NaOH) benyttet i stedet. 10 M Saltsyre (HCl) ble benyttet istedenfor konsentrert eddiksyre da denne syren var lettest tilgjengelig på laboratoriet. Forsøkene med vandige løsninger ga bedre resultat med ammoniumacetat enn NaOH, og også hvis NaOH ble nøytralisert med HCl og så tilsatt ammoniumacetat. Tilsvarende forsøk ble utført med urin der tilsatt av ammoniumacetat til urin etter basehydrolyse ble sammenliknet med nøytralisering med HCl før tilsatt av ammoniumacetat i ulike mengder. Donorvolum ved betingelsene var forholdsvis ulike og er definert Tabell 25. Betingelsene 1 og 3, 2 og 5 hadde samme volum på henholdsvis 1250  $\mu\text{l}$  og 1050  $\mu\text{l}$ . Betingelse 4 hadde total volum på 1450  $\mu\text{l}$ . Resultatet fra forsøket er vist i Figur 33 og Figur 34.



**Figur 33** Prosesseffektivitet i prosent for nøytralisert og ikke-nøytralisert urinprøver, og med ulike mengde 100 mM ammoniumacetat. Prøve: 450 µl urin, 50 µl prøveløsning (10 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat) og 50 µl internstandard (9,5 µg/ml THC-syre D3 i MeOH) med betingelse 1-5 definert i Tabell 25. Akseptor: 400 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 8 µl nonanol:undekanol 25:75 (v/v). Spenning: manuelt justert strøm til omtrent 400 µA. Ekstraksjonstid: 20 minutter. Agitasjon: 1800 rpm. n=1.



**Figur 34** RSD for oppnådd signalintensitet (toppareal) i prosent for nøytralisert og ikke-nøytralisert urinprøver (n=1), og med ulike mengde 100 mM ammoniumacetat

Det ble oppnådd høyest prosesseffektivitet med betingelse 1 på 16 % hvor prøveløsningen ikke ble nøytralisert med 10 M HCl, og RSD for oppnådd signalintensitet var lav for alle betingelser (2-5 %). Betingelse 1 og 3, og 2 og 5 er direkte sammenliknbare, der 1 og 5 er uten

nøytralisering, mens 2 og 3 nøytraliseres. I betingelse 1 og 3 er det tilsatt 500 µl ammoniumacetat og i 2 og 5 er det tilsatt 300 µl ammoniumacetat. Forskjellen mellom nøytralisert og ikke-nøytralisert er liten for begge parene.

Ettersom det kun ble utført en parallell av hver betingelse, dannet ikke dette et godt holdepunkt for resultatene. Donorløsninger med betingelsene 2-4 var alle nøytralisert, men tilsatt ulike mengder av 100 mM ammoniumacetat. Til tross for ulike donorvolum, kunne det grovt sett se ut til at 500 µl 100 mM ammoniumacetat ga høyest prosesseffektivitet. Selv om det ble oppnådd ganske like resultater ved de fleste betingelser, ble betingelse 1 valgt som den greieste betingelsen for urinprøver og ble benyttet i evalueringsforsøkene. Denne betingelsen ble ansett som enkleste da det ikke var nødvendig for å tilsette 10 M HCl til donorløsningen, men kun MilliQ-vann i stedet. Dette muliggjorde at MilliQ-vann kunne bli erstattet med tilsvarende mengde 100 mM ammoniumacetat, og dermed ekskludere et tilsetningstrinn.

Prosesseffektivitet oppnådd i dette forsøket var lavere enn det som var forventet etter forsøkene med vandige løsninger. Det er mulig at noe av dette kan skyldes instrumentvariasjoner da det har tidligere vært en del problemer med instrumentet (ved UiO), både med UHPLC og MS. Det ble også mistenkt lav prosesseffektivitet som følge av matrikseffekter, men dette ble senere avkreftet i evaluering av metoden under avsnitt 4.3.5. En annen mulighet er feil i tillaging av løsninger, og forsøket ville blitt gjentatt med både vandig prøve og urin i samme analyse hvis ikke UiO hadde blitt stengt. Det burde ha blitt utført ekstraksjon av flere paralleller av betingelse 1-5, som kunne ha danne et bedre bilde med tanken på deres betydning på ekstraksjonen av THC-syre fra urin.

Ettersom donorvolum inngår i ekstraksjonsparameterne, og dermed påvirker ekstraksjon-sutbytte og prosesseffektivitet, skulle dette ha blitt tatt i betraktning. For at volumene i de ulike betingelsene skulle ha vært like, kunne det ha blitt tilsatt MilliQ-vann slik at totalvolumet ble lik for alle prøver. Denne fremgangsmåten ble gjort i de senere forsøk.

Ekstraksjonsbetingelser benyttet i forsøket er oppsummert i Tabell 22.

### **4.3 Evaluering av metoden**

For evaluering av metoden ble to ulike retningslinjer for metodevalidering benyttet: en retningslinje fra Det europeiske legemiddelkontoret (European Medicines Agency, EMA) og

en retningslinje fra Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX). Kravene som benyttes i oppgaven for vurdering av resultatene av evalueringsforsøkene, er blitt satt i henhold til kravene i disse retningslinjene.

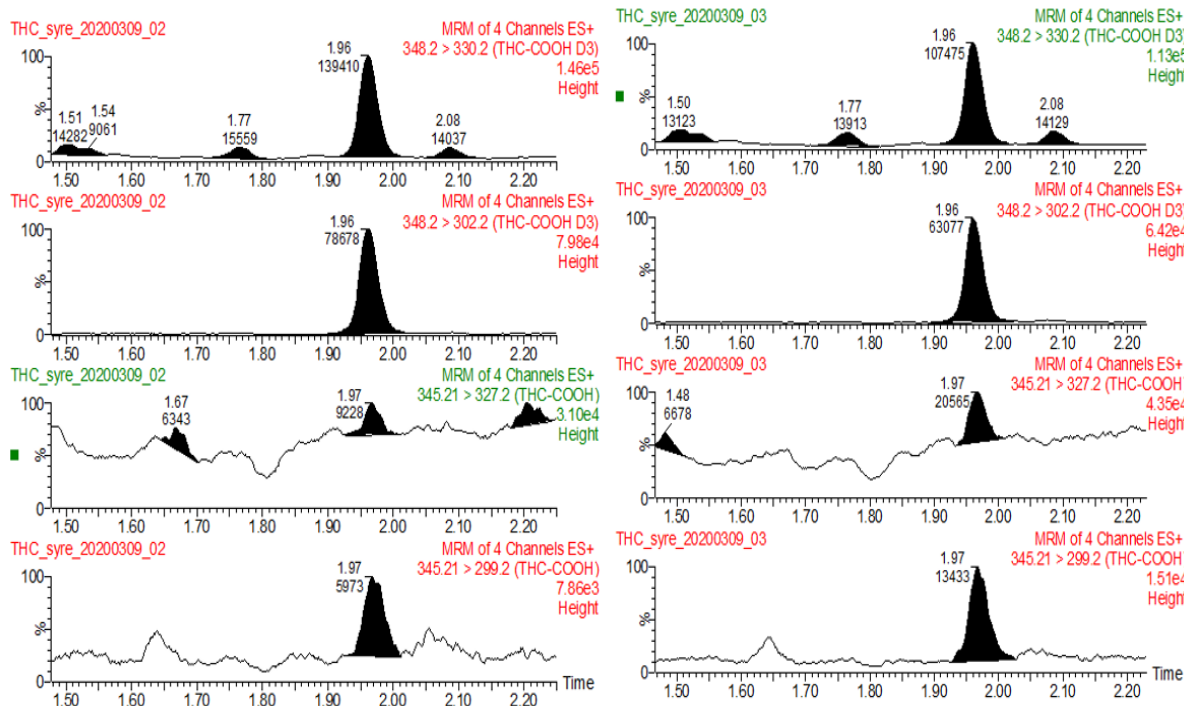
Ekstraksjonsbetingelsene benyttet i evalueringsforsøk er definert i Tabell 23.

### **Vurdering av bakgrunn i kromatogrammene**

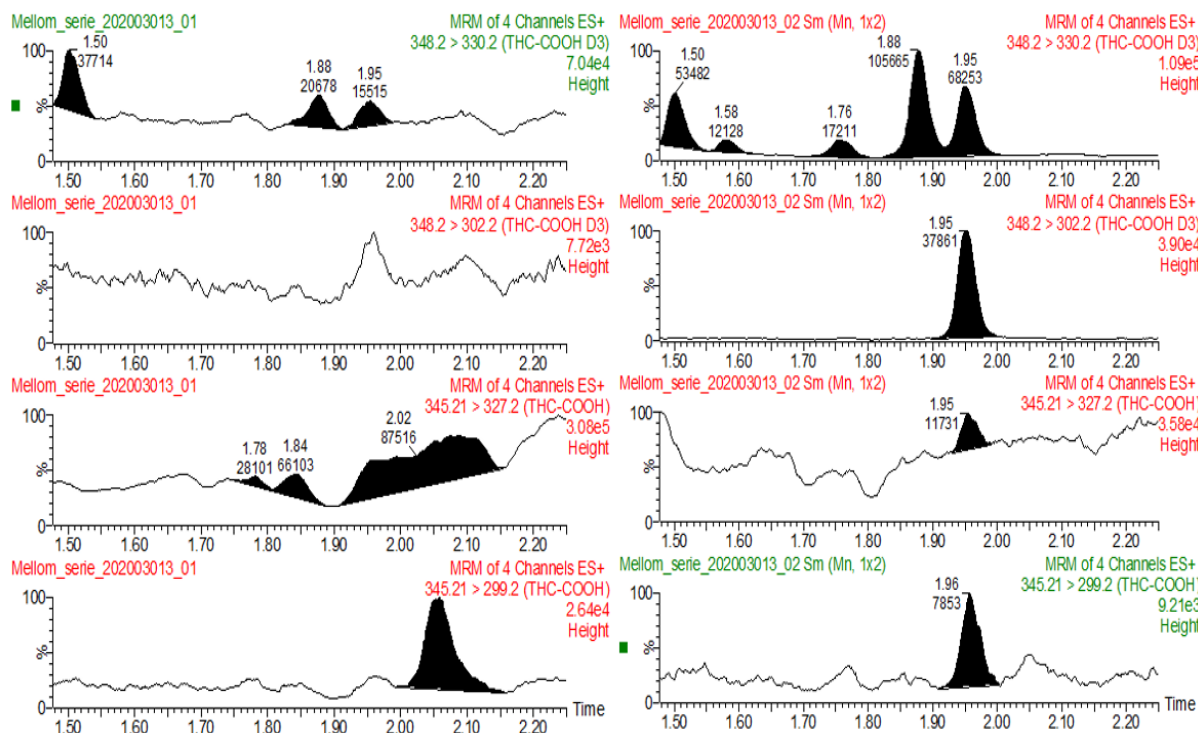
Det er kjent at urin inneholder endogene syrer [64]. Kromatogrammene fra kjøring av urinprøvene ble derfor studert for å se på bakgrunn. Det ble observert en topp ved 1,88 minutter i kromatogrammet for 0-prøve og Standard 1 i serie 4, som elueres før internstandard (se Figur 35). Dette ble ikke observert i kromatogrammene for 0<sup>+</sup>-prøve og Standard 1 i serie 1 i Figur 36. En mulig årsak til denne forskjellen i kromatogrammene er at det ble benyttet urin fra to forskjellige donorer. Sammensetning av urin hos det enkelte individ avhenger av flere faktorer, blant annet legemiddelinntak og kosthold. Dermed vil urinsammensetningen kunne variere fra person til person. For å undersøke dette, kunne det ha blitt analysert 0-prøver fra flere personer. Det hadde vært aktuelt å kjøre flere serier, eksempelvis seks serier [65].

I tillegg kan det tenkes at forstyrrelsene i prøvene kan påvirke den målte konsentrasjonen av THC-syre i prøvene ved muligens interferenser eller eventuelt matrikseffekter. Matrikseffekter ble senere avkreftet i avsnitt 4.3.5. Toppen som ble observert ved 1,88 minutter bør bemerkes da topphøyden/topparealet er omtrent like stor som overgangen for THC-syre, hvilket kan gi et betydelig bidrag dersom den koelueres med internstandard.

Det er usikkert på hva slags interferenser som er i ekstraktene som analyseres, men dette kunne ha vært interessant å undersøke nærmere ved å analysere flere ulike 0-prøver og serier.



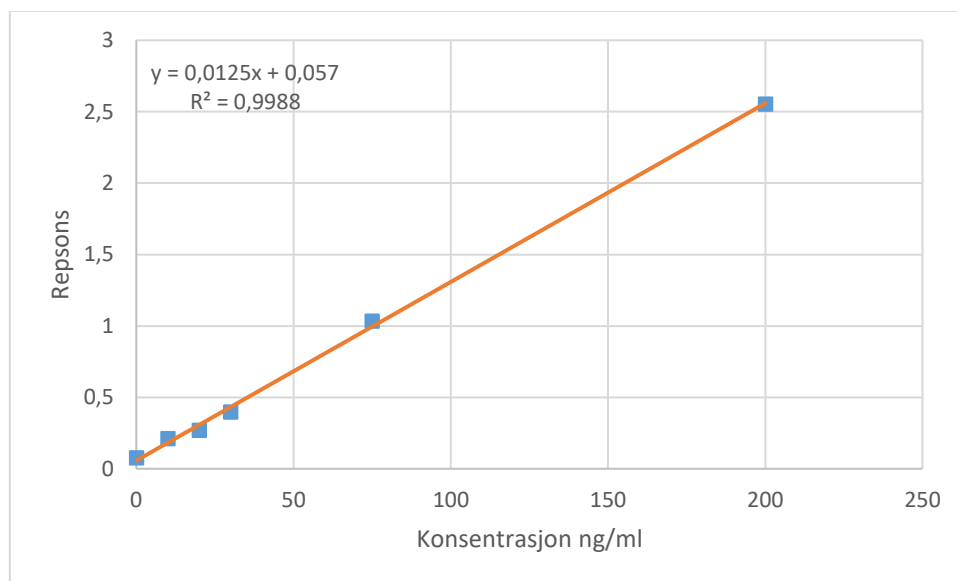
Figur 35 Kromatogrammer av 0+-prøve (venstre) og Standard 1 (høyre) i serie 1



Figur 36 Kromatogrammer av 0-prøve (venstre) og Standard (høyre) 1 i serie 4

### 4.3.1 Linearitet

Linearitet uttrykker sammenhengen mellom analyttkonsentrasjon i prøve og detektorrespons, og fremkommer ved lineær regresjon av data fra standardkurve. Linearitet er definert som  $r^2$  og beregnes fra regresjonslinjen. Kurvens  $r^2$  bør helst være mer enn 0,99, som indikerer god korrelasjon mellom analyttkonsentrasjon og respons [66]. Standardkurven med tilhørende regresjonslinje for THC-syre er vist i Figur 37.



**Figur 37** Standardkurve for THC-syre med regresjonslinje og korrelasjonskoeffisient ( $r^2$ )

Måleområdet for kurven var 10 ng/ml til 200 ng/ml og responsen ble målt som topphøyde. Det ble også analysert en 0-prøve og en 0<sup>+</sup>-prøve, som var ment å ikke gi noe respons på THC-syre. 0<sup>+</sup>-prøven skulle gi respons på internstandard, da det er blitt tilsatt internstandard, men det ble observert en liten topp for THC-syre i prøven (se Figur 35). Det ble ikke tilsatt noen standarder i donorvial. Det kan tenkes at vialene som ble benyttet, kan ha inneholdt rester av THC-syre. Ettersom det var kun åtte vialer tilgjengelig til alle forsøkene, måtte de vaskes med vann og etanol etter bruk. Det er tiltenkt fra produsentens side at disse vialene skal være til engangsbruk, men på grunn av begrenset tilgang til disse vialene, ble vialene benyttet flere ganger. Det kan tenkes at rester av THC-syre vil være igjen etter bruk, særlig etter ekstraksjon av prøve-løsninger, standarder eller kontroller med høy konsentrasjon.

Ettersom metodens  $r^2 \geq 0,99$ , kan metoden benyttes for kvantifisering.



### 4.3.2 Presisjon og nøyaktighet

Presisjon definerer spredning i analyseresultatene og er angitt som RSD i denne oppgaven [66]. Lav RSD indikerer liten spredning i analyseresultatene og dermed god presisjon.

Nøyaktighet definerer avvik fra sann verdi, som er forskjellen mellom målt analyseresultat og teoretisk referanseverdi [66]. Nøyaktighet er i denne oppgaven angitt som prosentavvik fra teoretisk konsentrasjon.

Presisjon både innen serie (reperbarhet) og presisjon mellom serie (reproduserbarhet), samt nøyaktighet skal maksimalt være  $\pm 20\%$  på hvert konsentrasjonsnivå [58]. Kravet er satt etter SWGTOX sin standard prosedyre for metodevalidering innenfor rettstoksikologi.

#### Reperbarhet og nøyaktighet (variasjon innen serie)

Resultatet for presisjon og nøyaktighet innen serie er vist i Tabell 34, samt gjennomsnitt av målt konsentrasjon og teoretisk konsentrasjon av THC-syre. Det ble ekstrahert seks paralleller av Kontroll 2.

**Tabell 34** Repeterbarhet og nøyaktighet (teoretisk og målt konsentrasjon er oppgitt som ng/ml, n = 6)

Parallell	Teoretisk	Målt	Gjennomsnitt målt	RSD	Nøyaktighet
1	50	152,5854			
2	50	37,3402			
3	50	47,5344	41,2	11,7 %	-18 %
4	50	44,5817			
5	50	42,4372			
6	50	34,2614			

Presisjon og nøyaktighet målt for fem av seks paralleller innen serien var innenfor grensen på  $\pm 20\%$ . Det er blitt valgt å ekskludere den første parallellen av Kontroll 2 (grå kolonne), ettersom målt konsentrasjon var svært avvikende fra de fem andre. Konsentrasjonen som ble målt var 152,6 ng/ml. Årsaken til dette kan være at Kontroll 3 ble benyttet istedenfor Kontroll 2, som da har konsentrasjon på 1,5  $\mu\text{g/ml}$  og skulle tilsvare 150 ng/ml (se Tabell 27).

### Reproduserbarhet og nøyaktighet (variasjon mellom serier)

Resultatet for presisjon og nøyaktighet mellom serier er vist i Tabell 35, samt gjennomsnitt av målt konsentrasjon og teoretisk konsentrasjon av THC-syre. Det ble ekstrahert to paralleller av Kontroll 1-3 i tre ulike serier (serie 1, 3 og 4).

**Tabell 35** Reproduserbarhet og nøyaktighet (teoretisk og målt konsentrasjon er oppgitt som ng/ml, n = 2)

Paralleller	Teoretisk	Målt Serie 1	Målt Serie 3	Målt Serie 4	Gjennomsnitt målt	RSD	Nøyaktighet
Kontroll 1 (#1)	15	14,8	9,3	12,6	14,2	43 %	-5 %
Kontroll 1 (#2)	15	24,2	5,4	18,82			
Kontroll 2 (#1)	50	44,9	42,4	37,6	42,1	13	-16
Kontroll 2 (#2)	50	51,7	34,3	41,5			
Kontroll 3 (#1)	150	120,9	157,8	110,6	131,8	17	12
Kontroll 3 (#2)	150	110,4	159,4	*			

\*Ble ikke utført som følge av begrensning av tid da UiO stengte dørene kl 18.00 12. mars, da forsøket ble utført.

Nøyaktigheten målt for alle parallellene var innenfor kravet innenfor grensen på  $\pm 20\%$ , som indikerer akseptable verdier for alle valideringsparametere. Det var generelt lav variasjon mellom seriene for Kontroll 2 og 3, men større variasjon mellom seriene for Kontroll 1 hvor RSD er 43 %. Serie 3 har et spesielt stort avvik for Kontroll 1, hvor målt konsentrasjon er 9,3 ng/ml og 5,4 ng/ml, som er en del lavere enn teoretisk konsentrasjon på 15 ng/ml. En mulig årsak til lav konsentrasjon på 5,4 ng/ml, kan skyldes at Kontroll 1 og Standard 1 kan ha blitt vekslet ved utpipetteringen, som da ville ha gitt en teoretisk konsentrasjon på 10 ng/ml. Det kan også hende at Kontroll 1 ikke ble tilsatt i donorvialen, men heller rester av THC-syre i vialen kan ha blitt ekstrahert slik som nevnt under 4.3.1. Det kan dermed tenkes at de målte konsentrasjonene som var høyere enn teoretisk konsentrasjon, muligens kan skyldes urene vialer. Variasjon i målt konsentrasjon kan også forekomme som følgende av instrumentell variasjon, se avsnittet ovenfor.

Resultater fra validering av repeterbarhet ser ut til å være relativt lik resultater for reproduserbarhet når det gjelder Kontroll 2. Lav variasjon og lavt prosentavvik fra teoretisk verdi beregnet innen og mellom serier, beviser at det er mulig å oppnå god nøyaktighet med metoden, til tross for atskilte analyser dersom man ser bort fra Serie 3 med Kontroll 1. Variasjonen mellom serier kunne dermed med fordel blitt testet på nytt, samt teste noen flere serier.

### 4.3.3 Minste kvantifiserbare konsentrasjon (MKK)

MKK tilsvarer kvantifiseringsgrensen *Limit of Quantification* (LOQ), som er den laveste konsentrasjonen av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon i en gitt analysemetode [66]. MKK kan ansees som den laveste standarden i en kalibreringskurve. Et S/N-forhold på 10 ble benyttet som kvantifiseringsgrense, ettersom det er vanlig å benytte dette forholdet i kromatografi [66]. I tillegg burde presisjon og nøyaktighet være innenfor  $\pm 20\%$ , som er satt av SWGTOX [58].

Bestemmelse av MKK ble gjort ved å undersøke det laveste konsentrasjonsnivået (Standard 1) på 10 ng/ml, hvor presisjon og nøyaktighet ble undersøkt i de ulike seriene. Målt konsentrasjon, samt presisjon og nøyaktighet er vist i Tabell 36.

**Tabell 36** Presisjon og nøyaktighet for bestemmelse av MKK (målt konsentrasjon er oppgitt som ng/ml, n =1)

Standard 1 i ulike serier	Målt konsentrasjon	Gjennomsnitt målt konsentrasjon	RSD (%)	Nøyaktighet (%)
Serie 1	12,0756	11,3185	9	13
Serie 3	24,4474			
Serie 4	10,5613			

Standard 1 i evalueringsserie 1 og 4 var ganske like, sammenlignet med Kontroll 1 i serie 3 som er svært avvikende. Kontroll 1 i serie 3 ble dermed ekskludert fra beregningen i forhold til presisjon og nøyaktighet for bestemmelse av MKK. I serie 3 er den målte konsentrasjonen omtrent 24,5 ng/ml. Den avvikende konsentrasjonen kan skyldes av feil uttak av Standard 2 fremfor Standard 1, eventuelt i kombinasjon med rester av THC-syre i vialene slik som nevnt i punktene ovenfor.

RSD og nøyaktighet var begge innenfor den fastsatte grensen på  $\pm 20\%$ . Grovt sett ble MKK vurdert til å være 10 ng/ml. Ettersom RSD ble beregnet for to punkter (serie 1 og serie 4), er ikke dette er meget sterkt holdepunkt. Flere punkter (serier) burde ha blitt undersøkt for å bekrefte om MKK er 10 ng/ml.

Ved OUS er konsentrasjonsgrensen som bekrefter bruken ovenfor cannabis-produkter 10 ng/ml. I USA er den anbefalte konsentrasjonsgrensen litt høyere enn ved OUS på 15 ng/ml THC-syre [67]. Dermed er MKK som er oppnådd med denne metoden innenfor konsentrasjonen som kan bekrefte bruken av cannabis.

Det hadde vært interessant å undersøke muligheten for å oppnå lavere MKK. Det kan tenkes at lavere MKK kunne ha blitt oppnådd ved å benytte større mengde urin i donorvolum/økt donorvolum ved at det blir større volumforhold mellom donor- og akseptorløsning. Dette medfører økt oppkonsentrering og er en mulighet på å bedre respons. Samtidig hadde det vært aktuelt å analysere flere serier for å undersøke om man kan oppnå de samme kravene som er blitt satt, og dermed undersøke usikkerheten i systemet.

#### 4.3.4 Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet

Ved utvikling av nye ekstraksjonsmetoder for å bestemme mengde analytt i biologiske prøver, er det nødvendig å ha kontroll på hvor mye analytt som kan ekstraheres da prøveopparbeidelser som regel medfører noe tap av analytt [1].

I denne oppgaven ble både ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet undersøkt. Resultatet av ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet er vist i Tabell 37 og Tabell 38.

**Tabell 37** Gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte og RSD for et konsentrasjonsnivå (Kontroll 2, n= 5)

Ekstraksjonsutbytte (%)	RSD (%)
2	26

**Tabell 38** Gjennomsnittlig prosesseffektivitet og RSD for et konsentrasjonsnivå (Kontroll 2, n = 5)

Prosesseffektivitet (%)	RSD (%)
2	8

Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet oppnådd med denne metoden var betraktelig lavere enn forventet og lå på 2 %. Det kan observeres betydelig lav respons for prøvene hvor THC-syre ble tilsatt før ekstraksjon sammenlignet med prøver hvor både analytt og internstandard ble tilsatt etter ekstraksjon, samt *spiked* akseptorløsning (se Vedlegg 8).

Ettersom responsen av ekstraktene med tilsatt THC-syre før ekstraksjon er lav, ble dermed beregning av ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet lav. Da følgende prøver fikk lav respons, kan det tyde på at dette ikke skyldes ekstraksjonsmetoden ettersom det har resultert i bedre respons i andre evalueringforsøk. Det er meget stor sannsynlighet for at feil kontroll-løsning ble overført til vialene da det ble tillaget en ny Kontroll 2. Den nye Kontroll 2 ble fortynnet til samme konsentrasjon slik som definert i Tabell 12, men 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat ble benyttet som fortynningsløsning i stedet for 100 mM ammoniumacetat. Det kan dermed tenkes at THC-syre var godt løselig i donorløsningen til tross for at THC-syre blir ionisert, ettersom løsningen nå ble noe upolar. Dette kan være en sannsynlig årsak for at lite analytt ble ekstrahert over i akseptorløsning til tross for at andre ekstraksjonsbetingelser lå til rette for ekstraksjon av analytten.

Et nytt forsøk burde ha blitt utført for å kunne bestemme ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet. Ettersom UiO ble stengt for arbeid, kunne ikke dette gjennomføres. Ved et tiltenkt nytt forsøk, ville de samme ekstraksjonsbetingelsene ha blitt benyttet, med nye kontrollerte løsninger.

#### **4.3.5 Matrikseffekter**

Som nevnt innledningsvis er LC-MS/MS særlig utsatt for matrikseffekter. Evaluering av matrikseffekter er dermed viktig del av validering av nye bioanalytiske metoder. Matrikseffekter kan evalueres på flere måter, hvorav de to mest anvendte metodene er post-koloniefusjon som beskrevet av Bonfiglio et. al. [68] og post-ekstraksjon med *spiking* som beskrevet av Matuszewski et. al. [59, 69]. I denne oppgaven ble Matuszewskis metode benyttet for evaluering av matrikseffekter [59].

Absolutte og relative matrikseffekter ble beregnet og er definert i Tabell 39. Absolutt matrikseffekt (ME) skal helst være innenfor 75-125 %, mens relativ matrikseffekt (RSD) skal helst være innenfor 15 % [58]. I motsetning til verdier over og under 100 % som indikerer

henholdsvis forsterket og undertrykket ioneintensitet, indikerer 100 % ingen observert matrikseffekt [59].

**Tabell 39** Absolutt matrikseffekt (ME) og relativ matrikseffekt (RSD)

<u>Uten korrigering med internstand</u>		<u>Med korrigering med internstandard</u>	
ME (%)	RSD (%)	ME (%)	RSD (%)
87	2	104	3

ME og RSD ble beregnet både med og uten korrigering av internstandard. Det var ikke store forskjeller i RSD beregnet med og uten korrigering internstandard sammenlignet med verdier for ME. Alle verdiene for ME var innenfor den oppgitte grensen på  $\pm 25\%$  (75-125 %), og det samme gjelder verdiene for RSD som var innenfor 15 %. Dette bekreftet at det ikke oppstår matrikseffekter i systemet, som da er gunstig ved kvantitativ anvendelse av metoden.

#### 4.3.6 Holdbarhet

I enkelte tilfeller er det behov for at prøver blir reanalysert. Det var derfor nødvendig å undersøke holdbarheten av ekstraktene ved henstand i autosamplere. Den første serien av ekstrakter som ble analysert, ble oppbevart i autosampleren i fire dager før den ble reanalysert. Konsentrasjonen av THC-syre i Kontroll 1-3 ble undersøkt, hvor det ble ekstrahert to paralleller av hver kontroll.

Holdbarheten til ekstraktene er angitt som prosentavvik fra opprinnelig målt konsentrasjon og er presentert i Tabell 40. Avviksgrensen ble satt i henhold til EMA sine retningslinjer for metodevalidering på  $\pm 15\%$  [65].

**Tabell 40** Prosentavvik fra opprinnelig målt konsentrasjon av THC-syre etter oppbevaring ved 10 °C i fire dager

Kontroller	Konsentrasjon målt ved dag 1	Konsentrasjon målt ved dag 5	Avvik i konsentrasjon
Kontroll 1	14,7956	19,2912	30 %
Kontroll 1	24,2186	25,3217	5 %
Kontroll 2	44,9343	49,3708	10 %
Kontroll 2	51,6919	51,5317	0 %

<b>Kontroller</b>	<b>Konsentrasjon målt ved dag 1</b>	<b>Konsentrasjon målt ved dag 5</b>	<b>Avvik i konsentrasjon</b>
Kontroll 3	120,8499	120,1701	-1 %
Kontroll 3	110,3609	96,17	-13 %

Fra Tabell 40 kan det observeres prosentavvik < 15 %, unntatt den første Kontroll 1 med avvikende konsentrasjon på 30 %. Holdbarheten ble derfor vurdert å være tilfredsstillende.

## 5 Avsluttende bemerkninger

Det var planlagt å utføre en del forsøk i forbindelse med oppgaven, men alt ble ikke gjennomført. Slik som det er blitt nevnt under avsnitt 3.9, ble Universitetet i Oslo stengt da det ble innført en rekke tiltak på nasjonalt nivå for å hindre videre smitte av Covid-19. Enkelte parametere kunne ha vært interessant å undersøke grundigere dersom det hadde vært tilstrekkelig med tid. I dette avsnittet vil slike parametere bli oppsummert, samt forsøk som ikke ble utført. Enkelte parametere er blitt diskutert og foreslått underveis i oppgaven, men blir oppsummert her avslutningsvis.

### Ekstraksjon med hårprøver

Det var planlagt å utføre ekstraksjoner med hårprøver på OUS. Dette var blitt avtalt på forhånd, men ble ikke gjennomført siden Universitetet i Oslo ble stengt og Avdeling for Rettsmedisinske fag ved OUS ble stengt for eksternt arbeid, som følge av tiltak for coronaviruset Covid-19.

På OUS benyttes væske-væske ekstraksjon som prøveopparbeidelse av hårprøver [70]. Det var planlagt å bruke det kommersielle utstyret og følge den etablerte metoden for prøveopparbeidelse av hårprøver utviklet ved OUS. Alle punktene frem til hvor hårprøven skulle reløses og nøytraliseres, skulle følges. Ved dette punktet var det tiltenkt å tilsette 50 mM ammoniumacetat, og muligens saltsyre for å nøytralisere prøveinnholdet før det ble ekstrahert og analysert. Det var planlagt å sammenligne ekstraksjonsutbyttet benyttet med EME og den etablerte metoden hos OUS.

### Optimalisering av pH

Ettersom den første bufferen benyttet i oppgaven som tilgjengelig på laboratoriet, hadde pH 10,2, ble det benyttet 50 mM ammoniumacetat pH 10,2 initialt. Dermed ble alle ammoniumacetatbufferne tillaget i pH 10,2. Dette var for å kunne oppnå et så likt ekstraksjonssystem i de fleste forsøk, og dermed enklere å sammenligne ulike forsøk. Fra Figur 8 (avsnitt 3.1), kan det observeres to ladede former av THC-syre (gul og rød graf). Initialt var det tiltenkt å deprotonere syre-gruppen på molekylet, som har pKa-verdi på 4,02. Det hadde vært interessant å undersøke prosesseffektivitet eller ekstraksjonsutbytte ved å benytte buffer med pH som har to pKa-enheter høyere enn pKa-verdien, derav pH 6,02, og det hadde vært interessant å undersøke ammoniumacetat med pH 6-7.



### **Optimalisering av strøm**

I de fleste forsøk ble det benyttet konstant strøm på omtrent 400  $\mu\text{A}$ , da det ble satt en maksimumsgrense for strøm per brønn/vial på 50  $\mu\text{A}$  per 100  $\mu\text{l}$ . Denne grensen ble satt etter at det ble observert et relativt stabilt system med følgende strøm. Det er dermed usikkert om det ble benyttet lav eller høy strøm ved ekstraksjon selv om systemet var stabilt med denne strømmen. Da strøm er nødvendig for EME, hadde det vært aktuelt å undersøke optimal strøm med tanken på maksimal ekstraksjonsutbytte av THC-syre.

### **Likt donorvolum ved bruk av kommersielt utstyr**

I forbindelse med forsøk som omfattet nøytralisering av urinprøver samt tilsats av ulike mengder ammoniumacetat, ble ulike donorvolumer benyttet. Etersom donorvolum inngår i ekstraksjonsparameterne, skulle dette ha blitt tatt i betraktning da dette påvirker ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet. Det kunne ha blitt oppnådd likt donorvolum ved alle de fem betingelsene ved å tilsette MilliQ-vann. Det hadde vært enklere å sammenligne resultatene og ville nok ha gitt et mer beskrivende resultat.

### **Stabilitet av THC-syre i buffer**

Det ville ha vært interessant å undersøke stabiliteten av THC-syre i de ulike bufferne, ettersom det ble laget nye standardløsninger og prøveløsninger hver uke. I rutinesammenheng vil det være ønskelig å kunne bruke samme løsning over en lenger periode både for å spare arbeid og reagenskostnader.

### **Undersøkelse av bakgrunnelektrolytter**

Etersom det ikke var signifikant forskjell i prosesseffektiviteten ved nøytralisering av urin og urin uten tilsatt HCl, burde bakgrunnelektrolyttene  $\text{H}^+$  og  $\text{Cl}^-$  ha blitt undersøkt nærmere. Det hadde vært aktuelt å utføre de samme forsøkene, samt utføre flere paralleller enn det som ble utført.

### **Full validering av metode**

#### Presisjon og nøyaktighet

Det hadde vært aktuelt å undersøke presisjon innen serie (repeterbarhet) for flere konsentrasjonsnivåer dersom det hadde vært tilstrekkelig med tid. Det hadde i tillegg vært aktuelt å kjøre flere serier, eksempelvis seks serier for å se på presisjon mellom serier (reproduserbarhet).

### Ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet

Ettersom forsøket ga uventet lave resultater, mistenkes at det har skjedd en systematisk feil under gjennomførelsen. Det var sterkt ønskelig å utføre et nytt forsøk for å undersøke ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet, men dette kunne ikke gjennomføres da det ikke var mulig med adgang til laboratoriet.

### MKK

MKK kunne ha blitt undersøkt med flere serier, samt endre volum av akseptor- eller donor-løsning for å undersøke om oppkonsentrering kunne ha gitt lavere MKK.

### Spesifisitet

Det hadde vært aktuelt å undersøke spesifisitet til metoden dersom det var tilstrekkelig med tid. Dette er en viktig valideringsparameter som undersøker metodens evne til å bestemme mengde analytt nøyaktig i nærvær av andre substanser som kan forventes å være til stede i prøven. Det hadde vært relevant å undersøke sure preparater som for eksempel ikke-steroid anti-inflammatoriske midler (NSAIDs), paracetamol og antiepileptika som valproinsyre.

### Selektivitet

Det hadde vært aktuelt å undersøke urin fra flere personer (0-prøver) dersom det var tilstrekkelig med tid. Urin inneholder en del syrer. Dermed er det nødvendig å undersøke om mulige forstyrrelser (interferenser) i 0-prøver. Legemiddelbruk bør i tillegg tas i betraktning da enkelte donorer kan ha inntatt legemidler, som dermed kan gi litt forskjellige resultater.

### Holdbarhet

Det kunne i tillegg ha blitt gjennomført holdbarhetstest med andre oppbevaringsbetingelser, som for eksempel ved oppbevaring i romtemperatur eller fryser.

## 6 Konklusjon

I denne oppgaven ble EME for første gang anvendt til ekstraksjon av THC-syre fra biologiske prøver som urin. Det ble benyttet to ulike formater for ekstraksjonen, 96-brønnersformat og et kommersielt utstyr som er under utvikling hos Extraction Technology Norway AS. Ekstraktene med THC-syre ble analysert på UHPLC-MS/MS og ekstraksjonsbetingelsene ble optimalisert før det ble utført en evaluering av metoden. Avslutningsvis ble resultatene oppnådd med denne metoden vurdert for egnethet til kvantitativ analyse.

Innledningsvis ble SLM, akseptorløsning og donorløsning optimalisert med 96-brønnersformat da det tillot utførelse av flere ekstraksjoner samtidig. Optimalisering av disse betingelsene ga følgende resultater: nonanol:undekanol 25:75 (v/v) som SLM, akseptorløsning bestående 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat og 50 mM ammoniumacetat som donorløsning. Da det utføres basehydrolyse med hår- og urinprøver, ble ulike løsninger av 1 M NaOH undersøkt. Det viste seg at nøytralisering av 1 M NaOH med 1 M HCl og tilsetning av 100 mM ammoniumacetat kan se ut til å gi lovende resultater og ble nærmere undersøkt med det kommersielle utstyret.

Det kommersielle utstyret rommer større volum enn 96-brønnersplate, slik at det var nødvendig å undersøke optimalt akseptorvolum. 400 µl akseptorvolum ble vurdert som det laveste volumet som kan benyttes i dette systemet. Videre ble akseptorvolum sammen med ekstraksjonstid, risting og donorvolum optimalisert ved utførelse av et faktorforsøk med hensikt på ekstraksjonsutbytte og oppkonsentrering. Lavt donorvolum (800 µl) ga høyt ekstraksjonsutbytte ved maksimal ekstraksjonstid på 30 minutter og risting på 1800 rpm. Høy oppkonsentrering ble oppnådd ved lavt akseptorvolum på 400 µl og høyt donorvolum på 1400 µl, hvilket er forventet ved stor forskjell i volumforhold på donor- og akseptor. Videre ble donorløsning med prøve og urin undersøkt med tanken på nøytralisering av det basiske innholdet av 10 M NaOH benyttet til basehydrolyse. Det var ikke betydelige store forskjeller på nøytralisering av donorløsningen, men betingelse 1 ble vurdert som den enkleste betingelsen for urinprøver og ble benyttet i evalueringen av metoden. Betingelse 1 bestod av 100 µl 10 M NaOH, 100 µl MilliQ-vann og 500 µl 100 mM ammoniumacetat.

EME med betingelse 1 kombinert med bruk av UHPLC-MS/MS for raske analyser av urin ble evaluert. Evalueringen ga for det meste tilfredsstillende resultater for presisjon og nøyaktighet.

Standardkurvens  $r^2$  var omtrent 0,99 og viste at det ble oppnådd god linearitet med metoden, som dermed kan benyttes til kvantifisering. MKK ble grovt sett vurdert til å være 10 ng/ml. Det ble oppnådd meget lavt ekstraksjonsutbytte og prosesseffektivitet i evalueringsforsøket, og burde ha blitt undersøkt nærmere dersom det var innenfor oppgavens tidsramme. Matriks-effekter ble undersøkt og så ikke ut til å oppstå i dette systemet. Kromatogrammene var noe ulike med tanken på bakgrunn, som kan skyldes ulike urindonorere. Ekstraktene viste også god holdbarhet i opptil fire dager ved 10 °C.

Oppsettet og betingelsene for EME benyttet i denne oppgaven viste at metoden gir lovende resultater for ekstraksjon av THC-syre i urin med det kommersielle utstyret. Det kan derfor tenkes at videre optimalisering av flere ekstraksjonsparametere som for eksempel strøm og pH, kan bedre oppgavens resultater og at metoden kan benyttes til kvantifisering. Etersom covid-19 medførte stenging av Universitetet i Oslo og OUS ble stengt for eksternt arbeid, ble ikke ekstraksjon av THC-syre fra hårprøver utført. Det hadde vært interessant å undersøke ekstraksjon av hårprøver da dette kan være en meget aktuell og attraktivt applikasjonsområde for EME i fremtiden.

# Litteraturliste

1. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Introduksjon til prøveopparbeidelse, i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 276-281.
2. Moein, M.M., El Beqqali, A., og Abdel-Rehim, M., *Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies*. Journal of Chromatography B, 2017. **1043**: s. 3-11.
3. Pedersen-Bjergaard, S., Gjelstad, A., og Halvorsen, T.G., Sample Preparation, i *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. 1.utg. Hansen, S.H. og Pedersen-Bjergaard, S. (red.). 2015, John Wiley & Sons, Ltd: India. s. 73-113.
4. Petersen, N.J., et al., *Electromembrane Extraction from Biological Fluids*. Analytical Sciences, 2011. **27**(10): s. 965-965.
5. Drouin, N., Rudaz, S., og Schappler, J., *New Trends in Sample Preparation for Bioanalysis*. American Pharmaceutical Review, 2016. **19**: s. 62-66.
6. Ocaña-González, J.A., et al., *New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review*. Analytica Chimica Acta, 2016. **905**: s. 8-23.
7. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., *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.
8. Ghambarian, M., Yamini, Y., og Esrafil, A., *Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications*. Microchimica Acta, 2012. **177**: s. 1-24.
9. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): s. 183-190.
10. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction of polar basic drugs from plasma with pure bis(2-ethylhexyl) phosphite as supported liquid membrane*. Analytica Chimica Acta, 2016. **934**: s. 80-87.
11. Fernández, E., et al., *Complexation-mediated electromembrane extraction of highly polar basic drugs—a fundamental study with catecholamines in urine as model system*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017. **409**(17): s. 4215-4223.
12. Huang, C., et al., *Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma*. Journal of Chromatography A, 2015. **1425**: s. 81-87.
13. Payán, M.R., et al., *Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples*. Talanta, 2011. **85**(1): s. 394-399.
14. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of chromatography, 2007. **1152**(1): s. 220-225.
15. Strieglerová, L., Kubáň, P., og Boček, P., *Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(37): s. 6248-6255.
16. Šlampová, A., Kubáň, P., og Boček, P., *Electromembrane extraction using stabilized constant d.c. electric current—A simple tool for improvement of extraction performance*. Journal of Chromatography A, 2012. **1234**: s. 32-37.
17. Balchen, M., Reubsaet, L., og Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction of peptides*. Journal of Chromatography A, 2008. **1194**(2): s. 143-149.

18. Balchen, M., et al., *Fast, selective, and sensitive analysis of low-abundance peptides in human plasma by electromembrane extraction*. *Analytica Chimica Acta*, 2012. **716**: s. 16-23.
19. Farmakologiportalen. Tetrahydrocannabinolsyre (THC-COOH). [Internett] 09.09.2015 [sitert 03.04 2020]; Tilgjengelig fra: <http://www.farmakologiportalen.no/content/744/Tetrahydrocannabinolsyre-THC-COOH>.
20. Store Norske Leksikon. cannabis. [Internett] 24.02.2020 [sitert 26.03 2020]; Tilgjengelig fra: <https://sml.snl.no/cannabis>.
21. Pertwee, R.G., Pharmacological Actions of Cannabinoids, i *Handbook of Experimental Pharmacology*. Pertwee, R.G. (red.). Vol. 168. 2005, Springer-Verlag: Berlin. s. 2-51.
22. Huestis, M.A., Pharmacokinetics and Metabolism of the Plant Cannabinoids,  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol, Cannabidiol and Cannabinol, i *Handbook of Experimental Pharmacology*. Pertwee, R.G. (red.). Vol. 168. 2005, Springer-Verlag: Berlin. s. 657-690.
23. Oslo Universitetssykehus. Fakta om cannabis. [Dokument] 06.05.2020 [sitert 11.05 2020]; Tilgjengelig fra: <https://oslo-universitetssykehus.no/fag-og-forskning/nasjonale-og-regionale-tjenester/tsb/verktoy-for-fagutvikling/fakta-om-rusmidler/cannabis>.
24. The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). Cannabis and hallucinogens - World Drug Report 2019 [Rapport] 2019; Tilgjengelig fra: [https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19\\_Booklet\\_5\\_CANNABIS\\_HALLUCINOGENS.pdf](https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19_Booklet_5_CANNABIS_HALLUCINOGENS.pdf).
25. Russo, E.B., *Current Therapeutic Cannabis Controversies and Clinical Trial Design Issues*. *Frontiers in Pharmacology*, 2016. **7**(309): s. 1-19.
26. Huestis, M., Henningfield, J., og Cone, E., *Blood cannabinoids: I. Absorption of THC and formation of 11-OH-THC and THCCOOH during and after marijuana smoking*. *Journal of analytical toxicology*, 1992. **16**: s. 276-82.
27. Hall, W., *What has research over the past two decades revealed about the adverse health effects of recreational cannabis use?* *Addiction*, 2015. **110**(1): s. 19-35.
28. Russell, C., et al., *Routes of administration for cannabis use – basic prevalence and related health outcomes: A scoping review and synthesis*. *International Journal of Drug Policy*, 2018. **52**: s. 87-96.
29. Lunde, E.S. 1 av 7 unge har brukt cannabis siste året. 04.11.2019 [sitert 11.05 2020]; Tilgjengelig fra: <https://www.ssb.no/helse/artikler-og-publikasjoner/1-av-7-unge-har-brukt-cannabis-siste-aret>.
30. Statens legemiddelverk. Prosedyre for behandling med medisinsk cannabis innenfor dagens regelverk. [Internett] 30.01.2019 [sitert 12.05 2020]; Tilgjengelig fra: <https://legemiddelverket.no/bivirkninger-og-sikkerhet/rad-til-helsepersonell/behandling-med-medisinsk-cannabis-innenfor-dagens-regelverk>.
31. Harvey, D.J. og Brown, N.K., *Comparative in vitro metabolism of the cannabinoids*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1991. **40**(3): s. 533-540.
32. Grotenhermen, F., *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cannabinoids*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2003. **42**(4): s. 327-360.
33. Store Norske Leksikon. Ohms lov. [Internett] 25.11.2019 [sitert 15.2020 2020]; Tilgjengelig fra: [https://snl.no/Ohms\\_lov](https://snl.no/Ohms_lov).
34. Huang, C., et al., *Electromembrane extraction for pharmaceutical and biomedical analysis – Quo vadis*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015. **113**: s. 97-107.

35. Drouin, N., et al., *Electromembrane extraction: Overview of the last decade*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2019. **113**: s. 357-363.
36. Pedersen-Bjergaard, S., *Electromembrane extraction—looking into the future*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019. **411**(9): s. 1687-1693.
37. Gjelstad, A., Rasmussen, K.E., og Pedersen-Bjergaard, S., *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1): s. 29-34.
38. Petersen, N.J., et al., *On-chip electro membrane extraction*. Microfluidics and Nanofluidics, 2010. **9**(4): s. 881-888.
39. Petersen, N.J., et al., *On-Chip Electro Membrane Extraction with Online Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection*. Analytical Chemistry, 2011. **83**(1): s. 44-51.
40. Eibak, L.E.E., et al., *Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014. **406**(2): s. 431-440.
41. Eibak, L.E.E., et al., *Parallel electromembrane extraction in the 96-well format*. Analytica Chimica Acta, 2014. **828**: s. 46-52.
42. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Introduksjon til kromatografi, i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 139-151.
43. Hansen, S.H. og Reubsaet, L., High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) and High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (LC-MS), i *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. 1.utg. Hansen, S.H. og Pedersen-Bjergaard, S. (red.). 2015, John Wiley & Sons, Ltd: India. s. 123-172.
44. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Omvendt-fase-kromatografi, i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 162-169.
45. Reubsaet, L., Lundanes, E., og Greibrokk, T., High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), i *Chromatography. Basic principles, sample preparations and related methods*. 2014, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.: Weinheim.
46. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Apperatur for væskekromatografi (HPLC), i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 173-189.
47. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Massespektrometri, i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 246-275.
48. Schwartz, J.C., Senko, M.W., og Syka, J.E.P., *A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2002. **13**(6): s. 659-669.
49. Douglas, D.J., Frank, A.J., og Mao, D., *Linear ion traps in mass spectrometry*. Mass Spectrometry Reviews, 2005. **24**(1): s. 1-29.
50. Wagner, J.R., Mount, E.M., og Giles, H.F., 25 - Design of Experiments, i *Extrusion (Second Edition) - The Definitive Processing Guide and Handbook*. 2014, William Andrew Publishing: Oxford. s. 291-308.
51. Bowden, G.D., Pichler, B.J., og Maurer, A., *A Design of Experiments (DoE) Approach Accelerates the Optimization of Copper-Mediated 18F-Fluorination Reactions of Arylstannanes*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): s. 11370.
52. Montgomery, D.C., Introduction, i *Design and Analysis of Experiments - Eight Edition*. 2012, John Wiley & Sons, Inc.: New York. s. 1-24.
53. Box, G.E.P., Hunter, J.S., og Hunter, W.G., Factorial Designs at Two levels, i *Statistics for Experimenters - Design, Innovation, and Discovery (Second Edition)*. 2005, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken. s. 173-234.

54. Montgomery, D.C., The 2k Factorial Design, i *Design and Analysis of Experiments - Eight Edition*. 2012, John Wiley & Sons, Inc.: New York. s. 233-302.
55. Myers, R.H., Montgomery, D.C., og Anderson-Cook, C.M., Introduction, i *Response Surface Methodology - Process and Product Optimization Using Designed Experiments (Third Edition)*. 2009, John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken. s. 1-12.
56. ChemAxon. [Internett] [siteret 03.03 2020]; Søkeord: 1-hydroxy-6,6-dimethyl-3-pentyl-6H,6aH,7H,8H,10aH-benzo[c]isochromene-9-carboxylic acid]. Tilgjengelig fra: <https://chemicalize.com>.
57. Stat-Ease. *Design-Expert® Ver. 12 - Design of Experiments (DOE)*. [Dataprogram] Tilgjengelig fra <https://www.statease.com/software/design-expert/>.
58. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX), *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.
59. Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., og Chavez-Eng, C.M., *Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(13): s. 3019-3030.
60. Vårdal, L., et al., *Electromembrane extraction with solvent modification of the acceptor solution: improved mass transfer of drugs of abuse from human plasma*. Bioanalysis, 2019. **11**(8): s. 755-771.
61. Vårdal, L., 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.
62. Roman-Hidalgo, C., et al., *On-chip electromembrane extraction of acidic drugs*. ELECTROPHORESIS, 2019. **40**(18-19): s. 2514-2521.
63. Hosseiny Davarani, S.S., Moazami, H., og Mohammadi, J., *Impedometric monitoring of the behavior of the supported liquid membrane in electromembrane extraction systems: An insight into the origin of optimized experimental parameters*. Analytica Chimica Acta, 2016. **934**.
64. Hansen, S.H., Biological Samples: Their Composition and Properties, and Their Collection and Storage, i *Bioanalysis of Pharmaceuticals: Sample Preparation, Separation Techniques and Mass Spectrometry*. Hansen, S.H. og Pedersen-Bjergaard, S. (red.). 2015, John Wiley & Sons, Ltd: India. s. 23-30.
65. Committee for Medicinal Products for Human Use. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency [Dokument] 2011; Tilgjengelig fra: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf).
66. Pedersen-Bjergaard, S. og Rasmussen, K.E., Kvalitetstandarder, i *Legemiddelanalyse*. 2.utg. 2010, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS: Bergen. s. 488-500.
67. Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA). Analytes and Their Cutoffs. [Dokument] 2010 [siteret 05.04 2020]; Tilgjengelig fra: <https://www.samhsa.gov/sites/default/files/workplace/2010GuidelinesAnalytesCutoffs.pdf>.
68. Bonfiglio, R., et al., *The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1999. **13**(12): s. 1175-1185.
69. Van Eeckhaut, A., et al., *Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects*. Journal of Chromatography B, 2009. **877**(23): s. 2198-2207.
70. Krpo, M. Håranalyser ved Avdeling for rettsmedisinsk fag på Oslo Universitetssykehus. [Personlig kommunikasjon] 26.11. 2019



# Vedlegg

## Vedlegg 1: Oppsett for faktorforsøk, samt parametere undersøkt i dette forsøket

Std	Run	Factor 1 A: Time Minutes	Factor 2 B: Sample volume µl	Factor 3 C: Acceptor volume µl	Factor 4: D: Shaking RPM
21	1	20	1100	300	1300
2	2	30	800	400	800
11	3	10	1400	400	1800
12	4	30	1400	400	1800
5	5	10	800	800	800
6	6	30	800	800	800
9	7	10	800	400	1800
28	8	20	1100	600	1300
14	9	30	800	800	1800
23	10	20	1100	600	550
7	11	10	1400	800	800
20	12	20	1550	600	1300
8	13	30	1400	800	800
19	14	20	650	600	1300
16	15	30	1400	800	1800
25	16	20	1100	600	1300
18	17	35	1100	600	1300
27	18	20	1100	600	1300
10	19	30	800	400	1800
13	20	10	800	800	1800
24	21	20	1100	600	2050
1	22	10	800	400	800
17	23	5	1100	600	1300
15	24	10	1400	800	1800
26	25	20	1100	600	1300
3	26	10	1400	400	800
22	27	20	1100	900	1300
29	28	20	1100	600	1300
4	29	30	1400	400	800
30	30	20	1100	600	1300

Blå skrift: Fjernet fra datatolkning, uteliggere.

## Faktorer

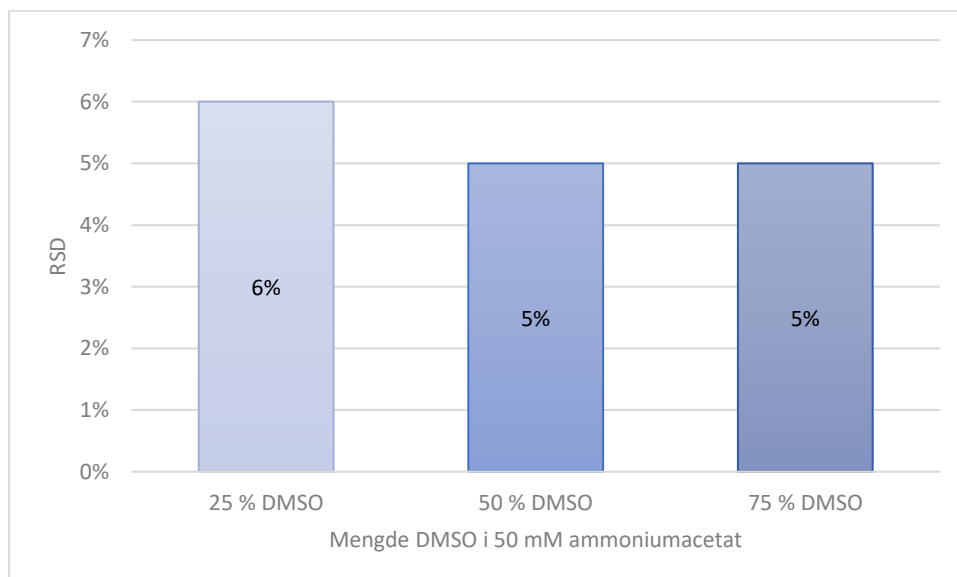
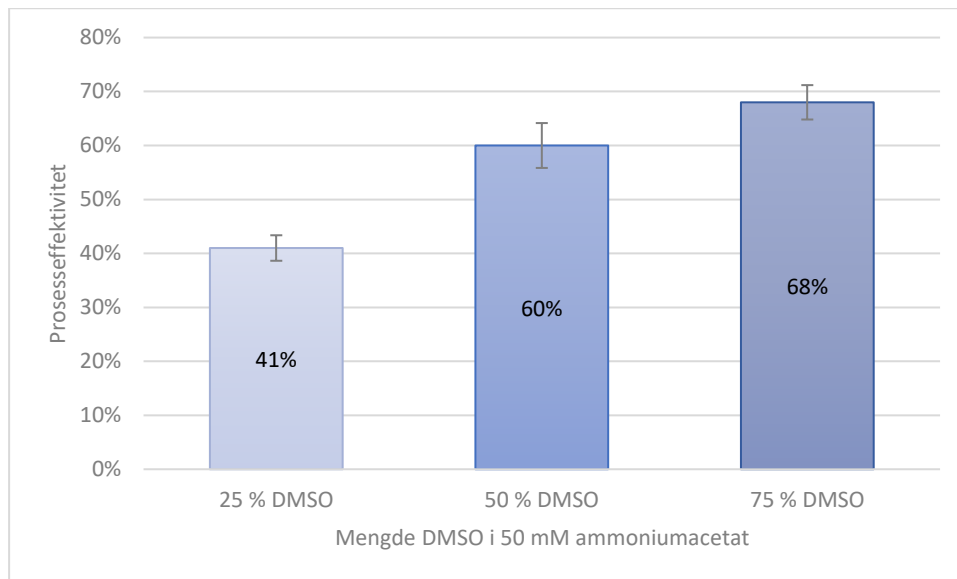
Factor	Units	Type	Minimum	Maximum	Coded Low	Coded High	Mean	Std. Dev
Time	Minutes	Numeric	5,00	35,00	-1 ↔ 10,00	+1 ↔ 30,00	20,00	8,41
Sample volume	µL	Numeric	650,00	1550,00	-1 ↔ 800,00	+1 ↔ 1400,00	1100,00	252,23
Acceptor volume	µL	Numeric	300,00	900,00	-1 ↔ 400,00	+1 ↔ 800,00	600,00	168,15
Shaking	RPM	Numeric	550,00	2050,00	+1 ↔ 1800,00	+1 ↔ 1800,00	1300,00	420,39

## Responser

Response	Name	Units	Observations	Analysis	Minimum	Maximum	Mean	Std. Dev.	Ratio	Transform	Model
R1	% recovery	%	28,00	Poly-nomial	30,9452	125,4	80,83	26,78	4,05	None	Reduced Quadratic
R2	EF		28,00	Poly-nomial	0,635953	3,55581	1,57	5,59	5,59	Natural Log	Reduced Quadratic

Merk at %recovery betegnes som prosesseffektivitet i oppgaven.

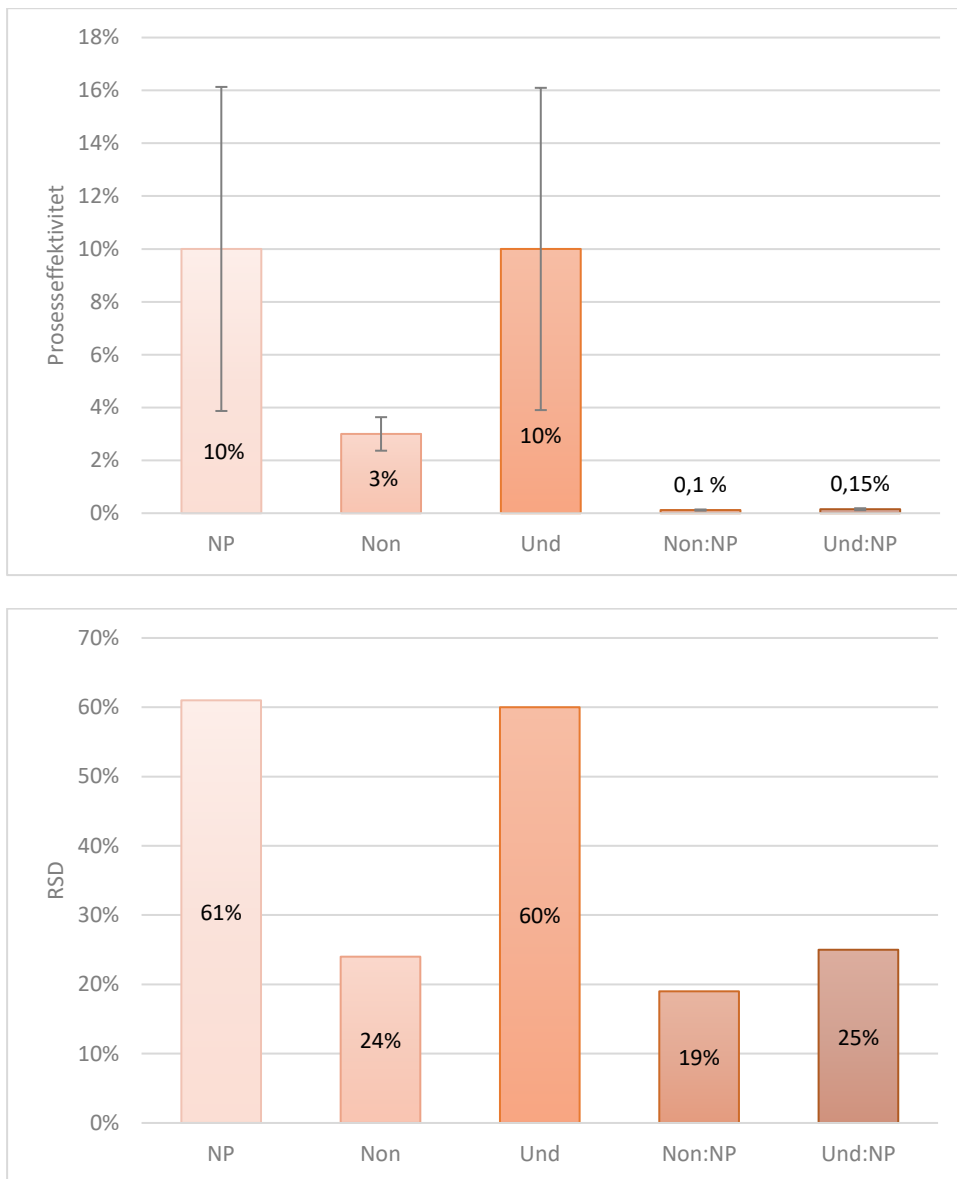
## Vedlegg 2: Prosesseffektivitet og RSD oppnådd med 25 %, 50 % og 75 % DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat



### Ekstraksjonsbetingelser

Prøve: 250 µl prøveløsning (0,5 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat). Akseptor: 25, 50 og 75 % DMSO tilsatt i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3 µl nonanol. Spenning: 50 V. Ekstraksjonstid: 6 minutter. Agitasjon: 900 rpm. n=4.

### Vedlegg 3: Prosesseffektivitet og RSD oppnådd ved ekstraksjon med ulike organiske løsemidler som SLM



#### Ekstraksjonsbetingelser

Prøve: 100 µl prøveløsning (1,25 µg/ml THC-syre i 50 mM ammoniumacetat). Akseptor: 100 µl 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat. SLM: 3 µl NPOE, nonanol, undekanol, nonanol:NPOE 50:50 (v/v), undekanol:NPOE 50:50 (v/v) og nonanol:undekanol 50:50 (v/v). Spenning: 40 V. Ekstraksjonstid: 60 minutter. Agitasjon:900 rpm. n=4.

**Vedlegg 4: Variansanalyse for kvadratisk modell med gjennomsnittlig ekstraksjonsutbytte som respons (fullstendig resultater)**

**Response 1: %recovery**

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	17939,77	7	2562,82	36,11	< 0,0001	significant
<b>A-Time</b>	10817,64	1	10817,64	152,40	< 0,0001	
<b>B-Sample volume</b>	3361,47	1	3361,47	47,36	< 0,0001	
<b>C-Acceptor volume</b>	13,06	1	13,06	0,1840	0,6725	
<b>D-Shaking</b>	1262,48	1	1262,48	17,79	0,0004	
<b>AD</b>	244,34	1	244,34	3,44	0,0783	
<b>CD</b>	304,66	1	304,66	4,29	0,0514	
<b>B<sup>2</sup></b>	1691,18	1	1691,18	23,83	< 0,0001	
Residual	1419,65	20	70,98			
<b>Lack of Fit</b>	1306,54	16	81,66	2,89	0,1573	not significant
<b>Pure Error</b>	113,11	4	28,28			
Cor Total	19359,42	27				

These rows were ignored for this analysis:

21, 8

Merk at med %recovery menes prosesseffektivitet i oppgaven.

**Vedlegg 5: Variansanalyse for kvadratisk modell med oppkonsentreringsfaktor som respons (fullstendig resultater)**

**Response 2: EF**

Transform: Natural Log

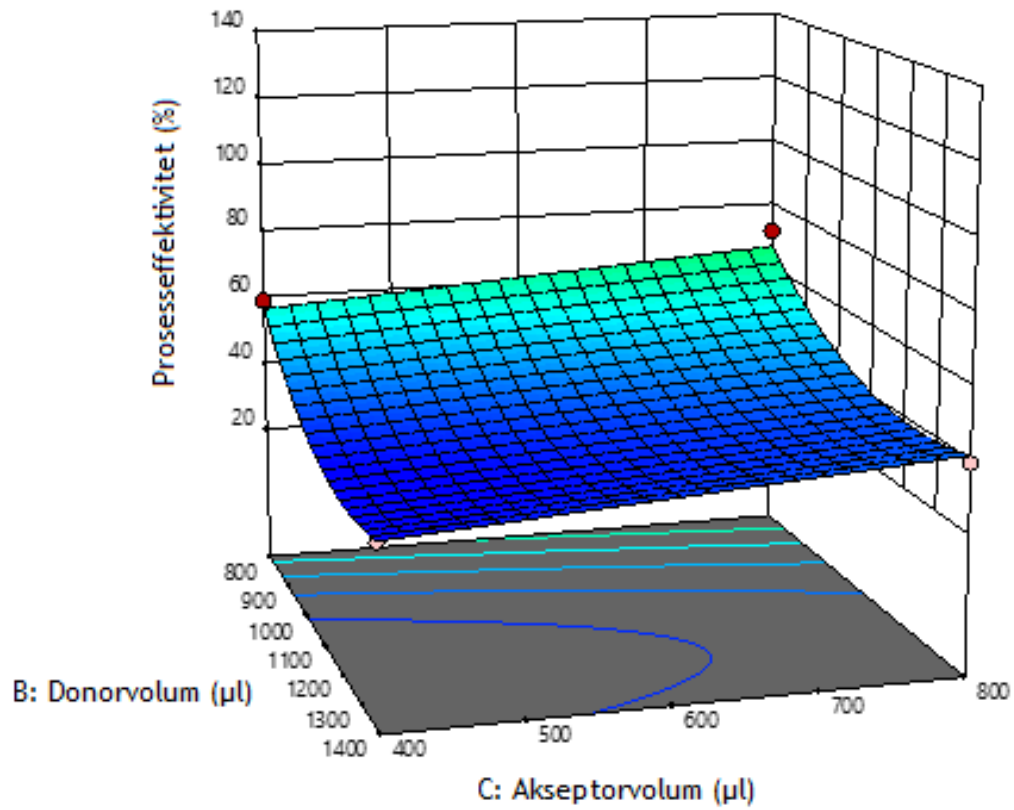
Constant: 0

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	5,54	10	0,5537	34,20	< 0,0001	significant
<b>A-Time</b>	2,01	1	2,01	124,31	< 0,0001	
<b>B-Sample volume</b>	0,2538	1	0,2538	15,67	0,0010	
<b>C-Accetor volume</b>	2,33	1	2,33	143,77	< 0,0001	
<b>D-Shaking</b>	0,3034	1	0,3034	18,74	0,0005	
<b>AB</b>	0,0700	1	0,0700	4,33	0,0530	
<b>AD</b>	0,1027	1	0,1027	6,35	0,0221	
<b>CD</b>	0,0826	1	0,0826	5,10	0,0374	
<b>A<sup>2</sup></b>	0,0512	1	0,0512	3,16	0,0933	
<b>B<sup>2</sup></b>	0,1143	1	0,1143	7,06	0,0166	
<b>C<sup>2</sup></b>	0,1677	1	0,1677	10,36	0,0050	
Residual	0,2752	17	0,0162			
<b>Lack of Fit</b>	0,2521	13	0,0194	3,35	0,1264	not significant
<b>Pure Error</b>	0,0232	4	0,0058			
Cor Total	5,81	27				

These rows were ignored for this analysis:

21, 8

**Vedlegg 6: Respons-overflateplott i 3D med prosesseffektivitet (%) som funksjon av akseptor- og donorvolum ved minimal tid (10 minutter) og risting (800 rpm)**





**Vedlegg 7: Prosesseffektivitet og oppkonsentreringsfaktor oppnådd i faktorforsøket**

<b>Forsøk</b>	<b>A: Tid (minutter)</b>	<b>B: Donor- volum (µl)</b>	<b>C: Akseptor- volum (µl)</b>	<b>D: Risting (rpm)</b>	<b>Prosess- effektivitet</b>	<b>Oppkons. faktor observert</b>	<b>Teoretisk oppkons. faktor</b>
1	20	1100	300	1300	85,1 %	3,12	3,67
2	30	800	400	800	122,7 %	2,45	2,00
3	10	1400	400	1800	69,6 %	2,44	3,50
4	30	1400	400	1800	101,6 %	3,56	3,50
5	10	800	800	800	71,9 %	0,72	1,00
6	30	800	800	800	110,0 %	1,10	1,00
7	10	800	400	1800	89,8 %	1,80	2,00
8	20	1100	600	1300	107,7 %	1,97	1,83
9	30	800	800	1800	125,4 %	1,25	1,00
10	20	1100	600	550	53,1 %	0,97	1,83
11	10	1400	800	800	39,3 %	0,69	1,75
12	20	1550	600	1300	86,7 %	2,24	2,58
13	30	1400	800	800	108,2 %	1,89	1,75
14	20	650	600	1300	115,3 %	1,25	1,08
15	30	1400	800	1800	95,6 %	1,67	1,75
16	20	1100	600	1300	63,7 %	1,17	1,83
17	35	1100	600	1300	111,2 %	2,04	1,83
18	20	1100	600	1300	74,5 %	1,37	1,83
19	30	800	400	1800	119,1 %	2,38	2,00
20	10	800	800	1800	86,1 %	0,86	1,00
21	20	1100	600	2050	138,5 %	2,54	1,83
22	10	800	400	800	59,4 %	1,19	2,00
23	5	1100	600	1300	34,7 %	0,64	1,83
24	10	1400	800	1800	49,4 %	0,86	1,75
25	20	1100	600	1300	75,6 %	1,39	1,83
26	10	1400	400	800	30,9 %	1,08	3,50
27	20	1100	900	1300	80,9 %	0,99	1,22
28	20	1100	600	1300	66,0 %	1,21	1,83
29	30	1400	400	800	70,1 %	2,45	3,50
30	20	1100	600	1300	67,2 %	1,23	1,83

Blå skrift: Fjernet fra datatolkning, uteliggere.

**Vedlegg 8: Tabell med respons og konsentrasjon for serie 2**

<b>Prøver</b>	<b>Topp-høyde</b>	<b>Målt kons.</b>	<b>Gjennomsnitt respons</b>	<b>Gjennomsnitt kons. ng/ml</b>
THC-syre etter ekstraksjon	1702305	53,8325	1580084,4	47,84704
	1709283	49,2814		
	1635598	47,5236		
	1453842	46,6882		
	1399394	41,9095		
THC-syre før ekstraksjon	47556	1,5639	32362,8	1,00504
	27465	0,786		
	23494	0,7023		
	29051	0,8513		
	34248	1,1217		
<i>Spiked</i> akseptorløsning	1779323	49,058	1811653	50
	1868419	50,7766		
	1791067	48,7553		
	1807803	51,4101		

Konsentrasjon målt i ng/ml

	<b>Ekstraksjonsutbytte</b>	<b>RSD</b>
<b>Uten IS</b>	2 %	26 %
<b>Med IS</b>	2 %	35 %

	<b>Prosesseffektivitet</b>	<b>RSD</b>
<b>Uten IS</b>	2 %	8 %
<b>Med IS</b>	2 %	9 %

## Vedlegg 9: Poster fra Kromatografi symposiet 2020<sup>i</sup>



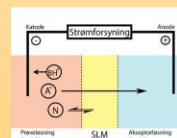
### Elektromembranekstraksjon av THC-syre

Kimmi Thoa Vo<sup>1</sup>, Marthe Lid<sup>2</sup>, Stig Pedersen-Bjergaard<sup>1,3</sup>, Elisabeth Leere Øiestad<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, Norge <sup>2</sup>Norsk medisinsk syklotronsenter AS, Norge <sup>3</sup>Institut for Farmaci, Københavns Universitet, Danmark

#### Bakgrunn

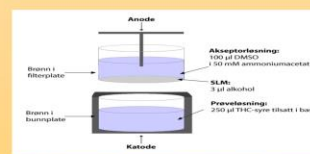
- Cannabis inneholder delta-9-tetrahydrocannabinol (THC), som er den forbindelsen som gir de psykoaktive effektene når man inntar cannabisprodukter (1). Undersøkelser av THC og metabolitten 11-nor-karboxy-delta-9-tetrahydrocannabinol (THC-COOH, også kjent som THC-syre) i biologiske materialer, utføres som en av rutineoppgavene ved rettskjemiske laboratorier.
- Det er publisert flere metoder for elektromembran ekstraksjon (EME) av basiske analytter i biologiske prøver, men teknikken er foreløpig i mindre grad anvendt for sure analytter.
- EME er en ekstraksjonsmetode som baserer seg på elektrisk migrasjon av ladede analytter (elektroforese) (figur 1). Analytter i prøven (donorløsning) lades før de vandrer gjennom en kunstig væskemembran (eng. supported liquid membrane, SLM) til en akseptorløsning, under påvirkning av strøm (2). Det foreligger ingen studier av EME av sure analytter i hår foreløpig.
- EME er en rask og kostnadseffektiv ekstraksjonsform, som er vist å gi rene ekstrakter som er kompatible med LC-MS (3). Dette er en aktuell ekstraksjonsmetode ved rettskjemiske laboratorier i fremtiden.



Figur 1: Prinsippet bak EME av sure analytter (A<sup>-</sup>). Basiske analytter (B<sup>+</sup>) forblir i prøveløsningen, mens nøytrale (N) kan vandre inn og ut av SLM.

#### Metode

- Oppsettet består av 96-brønnsbunnplate i metall (Instrumentverkstedet, Fysisk Institutt, UiO), en 96-brønnsfilterplate med polyvinylidenfluorid med porestørrelse 0,45 µm (Merck Millipore), toppplate med elektroder, strømforsyning og strømmåler.
- Ekstraksjon (figur 2):
  - Prøveløsning: 250 µl THC-syre tilsatt i base
    - Basisk prøveløsning for å ionisere THC-syre
  - Akseptorløsning: 100 µl DMSO i 50 mM ammoniumacetat
  - SLM: 3 µl alkohol
  - Risting i seks minutter med 900 RPM med spenning på 50 V.
  - Separasjon og deteksjon utføres på UHPLC-MS (ionefelle).



Figur 2: Skisse over EME-oppsettet for ekstraksjon av THC-syre.

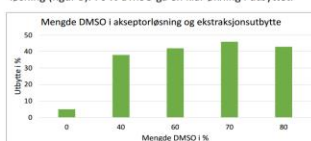
#### Problemstilling

- Formålet med denne studien (masteroppgaven) er å undersøke om EME kan benyttes til prøveoppbeidelse av THC-syre i biologiske prøver som urin og hår.
- Det undersøkes ulike løsninger som kan være egnet som SLM og om tilsatt av organiske løsemidler til akseptorløsningen kan gi økt utbytte.
- Ettersom standard metode for ekstraksjon av THC-syre i hår og urin ved rutine-laboratorier gjøres med basehydrolyse, er det nødvendig å undersøke base som fortynningsløsning av prøvene.
- Det vil utføres ulike valideringstester av de betingelsene som optimaliseres i oppgaven.

#### Resultater og diskusjon

##### Optimalisering av akseptor

Tidligere studier av EME av syrer har brukt langkjedete alkoholer som SLM. Innledende forsøk med nonanol ga relativt dårlig utbytte (ca. 5 %). THC-syre syrer er svært upolar (log P 5,2). Studier av upolare baser har vist at tilsatt av DMSO i akseptor kan øke ekstraksjonsutbyttet (4). Det ble derfor testet med økende mengde DMSO i akseptorløsning (figur 3). 70 % DMSO ga en klar økning i utbyttet.



Figur 3: Ekstraksjonsutbytte i prosent ved ulike mengder DMSO blandet med ammoniumacetat i akseptorløsning. (Donor: 50 mM ammoniumacetat, SLM: nonanol)

##### Optimalisering av donor

Ved analyse av THC-syre fra hår eller urin gjøres det en basehydrolyse for å spalte glukuronidet (urin) og oppløse håret for å frigjøre syren (hår). Nøytralisering av NaOH og tilsatt av ammoniumacetat ga omtrent dobbelt så høyt utbytte som ekstraksjon fra ren NaOH (figur 4).



Figur 4: Ekstraksjonsutbytte ved bruk av ulike blandinger med NaOH med ekstraksjonstid på 15 minutter. N: 1 M NaOH, 1 M NaOH + 1 M HCl, 1 M NaOH + 1 M HCl + 100 mM ammoniumacetat og 1 M NaOH + 1 M ammoniakk i vann. (Akseptor: 70:30 v/v DMSO:50 mM ammoniumacetat, SLM: nonanol)

##### Optimalisering av SLM

For å forsøke å øke utbyttet av THC-syre ble en mer langkjedet alkohol, undecanol, testet. Ekstraksjon med NPOE (2-nitrofenyl oktyleter) ble også gjennomført. Foreløpige resultater viste at undecanol ga høyest utbytte, men RSD er litt høy (figur 5).



Figur 5: Ekstraksjonsutbytte av THC-syre ved bruk av ulike organiske løsemidler som SLM. NP: NPOE, Non: nonanol, Und: undecanol, Non-NP: nonanol/NPOE, Und-NP: undecanol/NPOE, Non-Und: Nonanol/undecanol. (Donor: 50 mM ammoniumacetat, akseptor: 70:30 v/v DMSO:50 mM ammoniumacetat)

#### Konklusjon

- 70 % DMSO i 50 mM ammoniumacetat viste seg å gi høyest utbytte av de ulike mengdene DMSO som ble undersøkt.
- Undecanol ser foreløpig ut til å være en god SLM til ekstraksjon av THC-syre.
- EME kan benyttes til å ekstrahere THC-syre hvor prøveløsning er basisk ved å benytte nøytralisert NaOH-løsning med tilsatt ammoniumacetat.
- For å forbedre ekstraksjonen, bør man fortsette med å optimalisere gjeldende metode med andre parametere som ekstraksjonstid og spenning (strøm).

#### Referanser

- Europeisk overvåkingssenter for narkotika og narkotikamisbruk (EMCDDA). Europeisk narkotikarapport 2017: Trender og utviklinger. *The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction [EMCDDA]*. [Internett] 2017. [Siteret: 4 Desember 2019] <http://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/4541/TDAT17001NON.pdf>.
- Huang, Chuxiu, et al. Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma. *Journal of Chromatography A*. 2015, Volume 1425, ss. 81-87. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.052.
- Vardal, L., et al. Efficient discrimination and removal of phospholipids during electromembrane extraction from human plasma samples. *Bioanalysis* 2017, Volume 9, ss 631-641. doi:10.4155/bio-2017-0027
- Vardal, L., et al., Electromembrane extraction with solvent modification of the acceptor solution: improved mass transfer of drugs of abuse from human plasma. *Bioanalysis* 2019, Volume 11(8), ss 755-771. doi:10.4155/bio-2018-0308

<sup>i</sup> Vinner av posterpris for tredje beste poster