

MASTEROPPGAVE I FARMASØYTISK ANALYTISK KJEMI FOR GRADEN MASTER I FARMASI

Utvikling av en LC-MS/MS metode for kvantitativ analyse av klopidogrel og klopidogrelmetabolitter i serum

av

Tina Lovise Holmgren



Mai 2009

DET MEDISINSKE FAKULTET
Avdeling for legemiddelkjemi, Institutt for farmasi
Universitetet i Tromsø

FORORD

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for legemiddelkjemi, Institutt for farmasi, Universitetet i Tromsø. Laboratoriearbeidet pågikk fra midten av oktober 2008 og ble avsluttet i midten av april 2009. Prosessen frem mot en utviklet analysemetode har vært utfordrende, lærerik og til tider noe frustrerende.

Jeg vil rette en stor takk til hovedveileder Einar Jensen for at du har delt noe av all din analytiske kunnskap med meg og for at du har hatt tro på meg og mitt arbeide under hele prosessen. Jeg vil takke biveileder Trude Giverhaug for ditt bidrag, særlig innen farmakologi. Retter også en takk til Thor Trovik som var ekstern veileder under oppgaven.

Jeg vil også takke Terkel Hansen ved avdeling for legemiddelkjemi for gjennomlesing av oppgaven og mange gode engasjerende ideer underveis i laboratoriearbeidet. Jeg retter også en takk til Linn Christin Isaksen for korrekturlesing og gode ideer.

Jeg vil takke medstudent Karina Nilsen som har vært en god støtte og som helhjertet har tatt del i alle mine frustrasjoner. Jeg sender også stor takk til medstudent og lesesalskompanjong Anne Elisabeth Skjørholm. Våre store eller små problemløsinger, torsdager på Gründer og dine mange snertne kommentarer har gjort det lettere i tunge perioder.

Avslutningsvis vil jeg rette en stor takk til min samboer Rayner Wilhelmsen for at du har holdt ut med meg og vist meg en stor dose tålmodighet. Til slutt vil jeg rette en stor takk til mamma Ellinor og pappa Jan Petter Holmgren for deres tro på meg, uten dere hadde jeg ikke vært der jeg er i dag.

Til alle dere som ikke er nevnt, dere er likevel ikke glemt!

Tromsø, mai 2009

Tina Lovise Holmgren

SAMMENDRAG

Bakgrunn

Legemidlet Plavix® (klopidogrel) er en blodplatehemmer som brukes i kombinasjon med acetylsalisylsyre (ASA) som profylakse etter stentimplantasjon for å hindre dannelsen av stenttrombose. Klopidogrel er et prodrug og krever hepatisk biotransformasjon for å utøve sin antiaggregerende effekt. Bruken av klopidogrel har økt betraktelig de siste årene. I 2004 ble klopidogrel brukt av 17973 individer i Norge, mens det i 2007 var 23283 brukere. Samtidig har man blitt klar over at det er variasjonen i grad av respons på behandlingen, og nonrespons (resistens) ser ut til å være et økende problem.

Det overordnede formålet med denne oppgaven var å utvikle en metode for å identifisere non-respondere av klopidogrel. Målet var å utvikle en HPLC-MS/MS basert analysemetode for kvantitativ analyse av klopidogrel og dets metabolitter i serum.

Metode

Det ble utviklet en HPLC-MS/MS metode som ga god kromatografisk separasjon av tiklopidin, N-7084 og klopidogrel. Det ble analysert vandige prøver av klopidogrel og tiklopidin, og det ble analysert serumprøver som var tilsatt klopidogrel, tiklopidin og internstandard N-7084. Utfelling av proteiner i serum ble gjort med acetonitril og 10 % trikloreddiksyre i Milli-Q vann. Prøvene ble analysert direkte etter proteinutfelling, etter oppkonsentrering og etter fast-fase ekstraksjon hvor oppkonsentrering av prøver også ble utført.

Resultat

Metoden kan brukes til å måle klopidogrel, tiklopidin og metabolitter i serum, men det er nødvendig med videre optimalisering. Viktigste vil være å sikre en fullstendig utfelling av proteiner fra serum og utvikle en metode for analyse av klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitt. Metoden må valideres og prøves ut på reelle blodprøver fra pasienter behandlet med klopidogrel.

FORKORTELSER

5-HT	5-Hydroxytryptamine (serotonin)
ADP	Adenosine diphosphate
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization (Atmosfæretrykk-kjemisk- ionisasjon)
ASA	Acetylsalisylsyre
ATP	Adenosine triphosphate
BMI	Body mass index
CE	Collision Energy (Kollisjonsenergi)
CI	Chemical Ionization (Kjemisk ionisering)
C _{max}	Høyeste konsentrasjon av legemiddel som er observert i plasma
CV	Cone Voltage
CYP 450	Cytochrome P450
Da	Dalton
EI	Electron Ionization (Elektronionisasjon)
ESI	Electro Spray Ionization (Elektrosprayionisasjon)
eV	electron-volt
GC	Gas Chromatography (Gasskromatografi)
HCl	Saltsyre
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry (væskrokromatografi- massespektrometri)
LLE	Liquid-Liquid Extraction (væske-væske ekstraksjon)
LOD	Limit of Detection (minste detekterbare mengde)
LOQ	Limit of Quantification (minste kvantifiserbare mengde)
LPME	Liquid Phase Micro Extraction
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry (Massespektrometri)
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry (Tandem massespektrometri)
<i>m/z</i>	Mass to charge ratio
PCI	Percutaneous Coronary Intervention (Perkutan koronar intervensjon)
PP	Protein Precipitation (Proteinutfelling)
RBC	Red Blood Cell (Rød blodcelle, erytrocytt)

S/N	Signal to noise ratio
SIR	Selected Ion Recording
SPE	Solid Phase Extraction (Fast-fase ekstraksjon)
TCA	Trichloroacetic Acid (Triklorreddiksyre)
TOF	Time of flight
TxA ₂	Thromboxane A ₂
u	Atomic mass units
v/v	volume/volume
WBC	White Blood Cell (Hvit blodcelle, leukocyt)
w/v	weight/volum

INNHALDSFORTEGNELSE

1	INNLEDNING	1
1.1	Introduksjon.....	1
1.2	Fysiologi.....	1
1.3	Thienopyridin derivater	3
1.3.1	Klopidogrel	3
1.3.2	Tiklopidin	4
1.4	Non-respons.....	5
1.5	Legemiddelanalyse i biologisk materiale	7
1.5.1	Fast-fase ekstraksjon (SPE)	7
1.5.2	Utfelling av proteiner (PP) fra serum.....	8
1.6	High performance liquid chromatography (HPLC).....	9
1.6.1	Kromatografiske begreper	10
1.6.1.1	Retensjonstid (t_R).....	10
1.6.1.2	Kapasitetsfaktor (k').....	11
1.6.1.3	Selektivitet (α).....	11
1.6.1.4	Antall teoretiske plater (N).....	11
1.6.1.5	Høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H)	11
1.6.1.6	Oppløsningsevnen (R_S).....	12
1.6.2	Kvantitative analyser	12
1.6.3	Antall målinger langs toppen i kromatogrammet.....	13
1.7	Massespektrometri.....	14
1.7.1	Generelt.....	14
1.7.2	Ionekilder.....	14
1.7.2.1	Elektrosprayionisasjon:	14
1.7.3	Masseseparatorer	15
1.7.3.1	Quadropol masseanalysator.....	15
1.7.4	Deteksjon	16
1.7.5	Singel MS	16
1.7.5.1	Fullscan	16
1.7.5.2	SIR.....	16
1.7.6	MS/MS.....	17
1.7.6.1	Produktionscan	17
1.7.6.2	MRM	18
1.8	Internstandard	18
1.9	Formål.....	19

2	METODE	21
2.1	Internstandard	21
2.2	Tillaging av løsninger	21
2.2.1	Bruksløsninger fra tabletter.....	21
2.2.2	Bruksløsninger fra renstoff	22
2.3	Fast-fase ekstraksjon av renstoff i vandige prøver	22
2.4	Fast-fase ekstraksjon av renstoff fra serum	23
2.4.1	Utfelling av proteiner i serum med kald acetonitril	24
2.4.2	Utfelling av proteiner i serum med TCA	25
2.5	Utvikling av væskkromatografisk metode	26
2.5.1	Utvikling av isokratisk metode fra tablettprøver.....	26
2.5.2	Kromatografi av renstoff og internstandard i vandige prøver	26
2.5.3	Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin fra SPE av vandige prøver	27
2.5.4	Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin i serum tilsatt legemiddel	27
2.6	Utvikling av massespektrometrisk metode	28
2.6.1	MS.....	28
2.6.2	MS/MS.....	28
2.6.2.1	Produktionscan	28
2.6.2.2	MS/MS i MRM mode.....	29
2.6.3	HPLC-MS	29
2.6.3.1	Utvikling av SIR-metode.....	29
2.6.4	HPLC-MS/MS	29
2.6.4.1	Utvikling av MRM- metode	29
2.7	Analyse av blodprøver fra pasienter	30
3	RESULTAT OG DISKUSJON.....	31
3.1	Internstandard	31
3.2	Tillaging av løsninger	31
3.3	Fast-fase ekstraksjon av renstoff i vandige prøver	32
3.4	Fast-fase ekstraksjon av renstoff fra serum	33
3.4.1	Utfelling av proteiner i serum med kald acetonitril	34
3.4.2	Utfelling av proteiner i serum med TCA	36
3.5	Utvikling av væskkromatografi metode	36
3.5.1	Utvikling av isokratisk metode fra tablettprøver.....	36
3.5.2	Kromatografi av renstoff og internstandard i vandige prøver	37
3.5.2.1	Limit of detection (LOD)	39
3.5.2.2	Limit of quantification (LOQ)	40
3.5.2.3	Standardkurve.....	40
3.5.3	Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin fra SPE av vandige prøver	43
3.5.4	Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin i serum tilsatt legemiddel	47
3.5.4.1	Kromatografi av analyttene etter utfelling av proteinene i serum med acetonitril.....	47

Innholdsfortegnelse

3.5.4.2	Kromatografi av analyttene etter ufelling av proteinene i serum med TCA.....	59
3.6	Utvikling av massespektrometri metode.....	61
3.6.1	MS.....	61
3.6.2	MS/MS.....	63
3.6.2.1	Produktionscan	63
3.6.3	HPLC-MS	65
3.6.3.1	Utvikling av SIR-metode.....	65
3.6.4	HPLC-MS/MS	66
3.6.4.1	Utvikling av MRM- metode	66
3.7	Analyse av blodprøver fra pasienter	68
3.8	Framtidige aspekter for oppgaven	69
3.9	Nye P2Y₁₂ reseptor antagonister	70
4	KONKLUSJON	73
5	REFERANSER.....	75
6	APPENDIKS	77
6.1	Kjemikalier.....	77
6.1.1	Utgangsstoffer.....	77
6.1.2	Kjemikalier	77
6.1.3	Serum.....	77
6.1.4	Vann.....	77
6.2	Utstysliste	78
6.3	Tillaging av prøver til standardkurve i vandige løsninger	79
6.4	Tillaging av prøver til standardkurve ved SPE i serum.....	80
6.5	Tillaging av prøver til standardkurve ved SPE i serum 2	81
6.6	Tuningsverdier for MS.....	82

1 INNLEDNING

1.1 INTRODUKSJON

Fra 2000 til 2006 økte antallet sykehusinnleggelseser der hoveddiagnosen var hjerteinfarkt med 60 % [1]. Årsaken til hjerteinfarkt er oftest dannelse av blodpropp i hjertemuskelens kransarterier (koronararteriene). Dette vil forårsake redusert eller helt blokkert blodforsyning til en del av hjertemuskelen slik at muskelvevet i den berørte delen dør. Vanlig behandling av en slik tilstand vil være stentimplantasjon. For å forebygge at implantert stent tettes til, benyttes acetylsalisylsyre og blodplatehemmeren Plavix® (klopidogrel). Noen pasienter får likevel stent-trombose selv ved adekvat platehemmende behandling. Det antas at disse pasientene responderer dårligere enn normalt på behandlingen og en mulig årsak til dette kan være non-respons for klopidogrel.

1.2 FYSIOLOGI

Blodets faste bestanddeler er erytrocytter (Red Blood Cells, RBC), leukocytter (White Blood Cells, WBC) og trombocytter (blodplater). RBC er fullpakket med hemoglobin, og transport av oksygen til alle vev og organer er deres hovedfunksjon. WBC og et antall plasmaproteiner utgjør kroppens immunsystem. Trombocytene er involvert i hemostasen. [2]

Dersom det oppstår en skade på blodåreveggen, vil åreveggen først trekke seg sammen for å begrense blodtilstrømningen til skadestedet, og dermed redusere blodtap. Videre aktiveres blodplatene og fester seg til skadestedet hvor de danner en plateplugg. Umiddelbart etter at blodplatene har begynt å aggregere, frigir de ulike kjemiske forbindelser, blant annet adenosine diphosphate (ADP). ADP sender signal til flere sirkulerende blodplater i området, slik at disse aktiveres og fester seg til det første blodplatelaget. Disse blodplatene frigir også ADP, som sender signal til flere blodplater i området osv. På denne måten bygges platepluggen hurtig opp ved at flere og flere blodplater fester seg til skadestedet. Serotonin (5-HT), adrenalin og thromboxane A₂ (TX A₂) er flere forbindelser som frigis fra platepluggen. Disse forbindelsene fungerer som vasokonstriktorer og dermed forsterkes den innledende sammentrekningen av åreveggen. Det siste trinnet i hemostasen er selve koagulasjonen. Denne prosessen er en kaskade som i alt involverer 12 koagulasjonsfaktorer. Endepunktet av kaskaden er omdanningen av fibrinogen til fibrin ved hjelp av enzymet thrombin. Fibrin legger seg som et nett over platepluggen når det dannes kryssbindinger mellom fibrinmolekylene. [2]

1. Innledning

Koaguleringen kan også starte selv om det ikke er en blødning på stedet. Dette kan skje dersom områder av åreveggen er aterosklerotisk, ved endret blodstrøm eller dersom blodet har en unormal koaguleringssevne. [2, 3] Det dannes da en trombe som er bundet til åreveggen, og dersom tromben blir stor nok kan den blokkere blodsirkulasjonen i friske årer og dermed stoppe blodtilstrømmingen til ulike organer. Tromben eller deler av denne kan også løsne og følge blodstrømmen inntil den kommer til blodårer som har en mindre diameter. Der kan den sette seg fast og danne en emboli. Både trombose og dannelse av emboli er særlig alvorlig i organer som lunger, hjerte og hjerne, hvor de kan forårsake lungeemboli, iskemi, hjerneslag og hjerteinfarkt. I verste fall kan død bli en følge av disse. [2, 3]

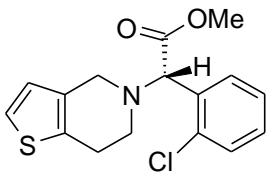
Det kan også forekomme en opphopning av blodplater og leukocytter på overflaten av implanterte stenter. En eventuell inflammasjon i åreveggen der stenten er plassert vil være årsaken. [4] Implantasjon av stent medfører derfor risiko for skade på åreveggen, og dette blir grobunn for en trombe. Den fysiologiske reaksjonen på stenten er å "kle" den med endotel. Denne prosessen tar tid, og inntil endotelialiseringen er fullstendig, er stenten trombogen.

Som nevnt tidligere er ADP involvert i hemostasen og i dannelsen av tromber. ADP som frigis fra aggregerende blodplater bindes til to G-proteinkoblede reseptorer kalt $P2Y_1$ og $P2Y_{12}$ ADP reseptorer på nærliggende sirkulerende blodplater [4, 5]. Når TxA_2 binder til thromboxan reseptorer på blodplatene, vil ADP's binding til $P2Y_{12}$ reseptorene resultere i at blodplatenes GPIIb/IIIa reseptorer som innehar bindingssteder for fibrinogen, uttrykkes. Koagulasjonskaskaden fører til at det dannes store mengder av enzymet trombin som katalyserer omdanningen av plasmaproteinet fibrinogen til fibrin på skadestedet. Fibrin bindes til GPIIb/IIIa reseptorene slik at det dannes et tett nettverk av kryssbundne blodplater på skadestedet. [2, 6]

$P2Y_{12}$ ADP reseptoren er angrepspunkt for flere antitrombotiske legemidler, hvor thienopyridin derivatene klopido-rel og tiklopidin er to eksempler. [6]

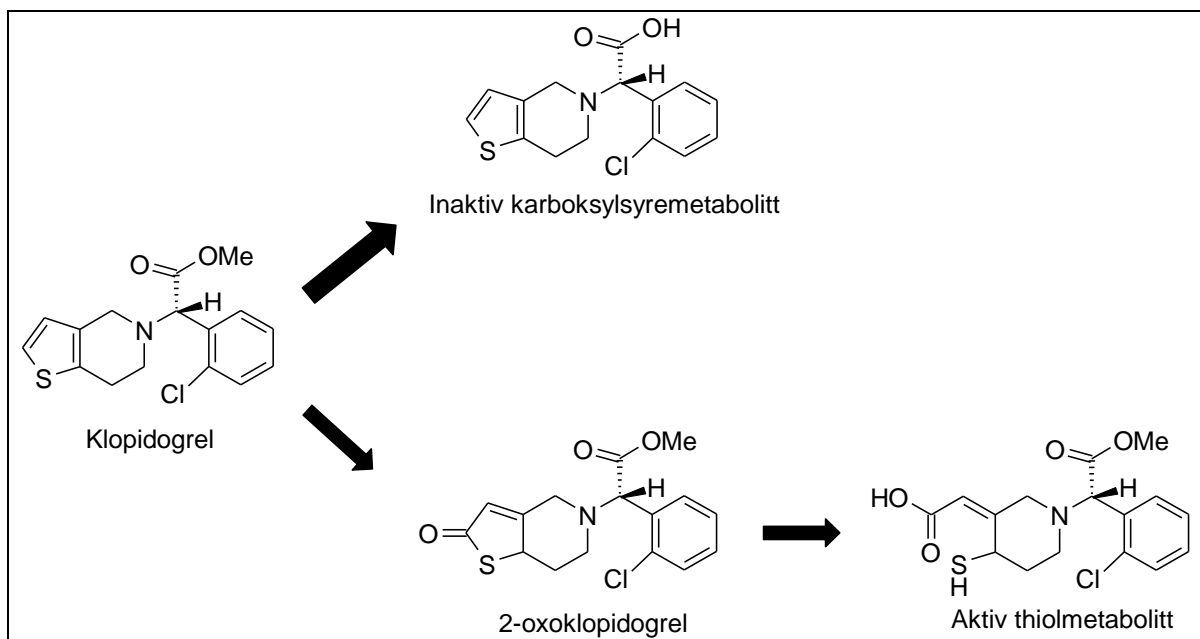
1.3 THIENOPYRIDIN DERIVATER

1.3.1 Klopido­grel



Figur 1: Strukturformel for S-enantiomeren til klopido­grel.

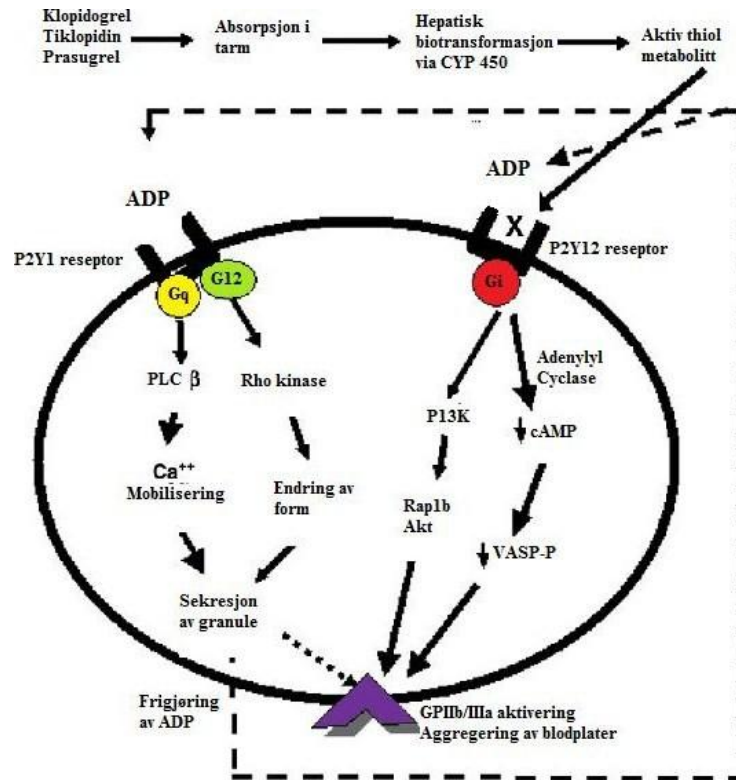
Klopido­grel brukes sammen med acetylsalisylsyre (ASA) som tromboseprofylakse etter stentimplantasjon i koronararteriene [7]. Klopido­grel absorberes raskt etter gjentatt dosering med 75 mg daglig, og modersubstansen har en konsentrasjon lik $0,00025 \text{ mg l}^{-1}$ ($0,25 \text{ ng ml}^{-1}$) 2 timer etter administrering [8]. Klopido­grel gjennomgår hepatisk biotransformas­jon via cytochrom P450 (CYP 450) 3A4, 3A5 og 2B6, og er et prodrug hvor 15 % omdannes til en aktiv thiol-metabolitt og 85 % omdannes til en inaktiv karboksylsyremetabolitt. [4, 7-9]



Figur 2: Hepatisk biotransformas­jon av klopido­grel. Modifisert etter Takahashi, M. et al., 2008. [10]

Den aktive metabolitten har kort levetid og binder irreversibelt til $P2Y_{12}$ reseptoren via en disulfidbinding som dannes mellom den aktive thiolgruppa og to cystein-enheter på reseptoren. Binding av klopido­grel til reseptoren inaktiverer reseptoren og gir en effektiv hemming av ADP- induisert aktivering og aggregering av blodplater. [4, 9, 11]

1. Innledning

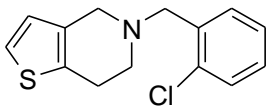


Figur 3: Virkningsmekanisme for klopidogrel, tiklopidin og prasugrel.

Modifisert etter Gurbel og Tantry, 2007. [11]

Hos friske frivillige er det observert en platehemmende effekt av klopidogrel allerede 2 timer etter administrering av en oral dose på 75 mg. Maksimal hemming av plateaggregering oppnås i løpet av 5-7 dager ved administrasjon av 75 mg daglig. Ved stentimplantasjon gis det ofte en støtdose (loadingdose) på 300 mg for å korte ned denne tiden. [4, 9]

1.3.2 Tiklopidin



Figur 4: Strukturformel for tiklopidin.

Tiklopidin kom på markedet som platehemmer i 1978. I likhet med klopidogrel er tiklopidin et prodrug hvor den aktive metabolitten hemmer ADP- avhengig aggregering av blodplater. Strukturmessig har klopidogrel en metylester i benzyrisk posisjon som tiklopidin mangler. Dette gir klopidogrel en økt farmakologisk virkning og gunstigere bivirkningsprofil i forhold til tiklopidin. [12] Grunnet dette brukes klopidogrel nå i større grad enn tiklopidin. I 2004 var

det 17973 individer i Norge som brukte klopidogrel, mot 520 som brukte tiklopidin, mens det i 2007 var det 23283 individer som brukte klopidogrel og 432 individer som brukte tiklopidin. [13]

1.4 NON-RESPONS

Noen pasienter utvikler tromboser etter stentimplantasjon til tross for platehemmende behandling. Dette kalles non-respons, og er observert etter stentimplantasjon hos 5 % til 44 % av pasientene i ulike studier [4]. Årsaken til de store variasjonene i ulike studier kan være at det administreres ulike doser, benyttes ulike definisjoner for hva som kan kalles non-respons, ulike laboratoriemetoder benyttes og tiden det tar før blodprøvene blir evaluert kan være varierende. Årsakene til non-respons er ikke fullstendig klarlagt, men mulige mekanismer kan være dårlig compliance, utilstrekkelig dosering, redusert absorpsjon fra tarm etter administrering, at enkelte plater har et høyt antall P2Y₁₂ reseptorer, polymorfisme av reseptorene på platene eller polymorfisme i intracellulære signalveier. Endret hepatisk metabolisme er også en mulighet. Redusert hepatisk omdannelse til den aktive metabolitten vil gi en redusert blodplatehemmende effekt. Både miljø og genetikk kan påvirke aktiviteten til ulike CYP- enzymer. Polymorfisme i genet for CYP 3A4 kan være et bidrag til variasjon i klopidogrelrespons [11]. Suh J et al. har også demonstrert en høyere klopidogrel respons hos personer som har CYP 3A5 expressor genotype sammenlignet med personer som har non-expressor genotype [11, 14]. Legemiddelinteraksjoner via CYP 3A4 enzymene er også mulige mekanismer for non-respons. Legemiddelinteraksjoner der CYP 3A4 er involvert vil kunne bidra til variasjon i den platehemmende effekten. Klopidogrels platehemmende effekt kan økes dersom indusere av CYP 3A4, f.eks. rifampicin og Johannesurt, brukes samtidig. Ved samtidig bruk av legemidler som hemmer CYP 3A4, f.eks. erytromycin, vil en kunne se redusert effekt av klopidogrel. [4] Det er også sett en forhøyet forekomst av nonrespons hos diabetikere og hos pasienter med forhøyet body mass index (BMI) [4, 6, 11].

Mangelfull platehemmende effekt kan resultere i dannelse av stent-trombose. Konsekvensene av dette kan være alvorlige (dødsfall, hjerteinfarkt, sykehusinnleggelse, behov for nytt inngrep). Non-respons vil dermed medføre store kostnader både pengemessig og ressursmessig for både pasient, sykehus, leger og staten. Dette kan mulig unngås dersom non-respons lar seg oppdage tidlig. Årlig utføres det ca 1500 stentimplantasjoner ved Universitetssykehuset Nord- Norge. Dersom non-respons av klopidogrel forekommer i ca

20 % av disse tilfellene sier det seg selv at det kan bli en kostbar affære for alle involverte parter.

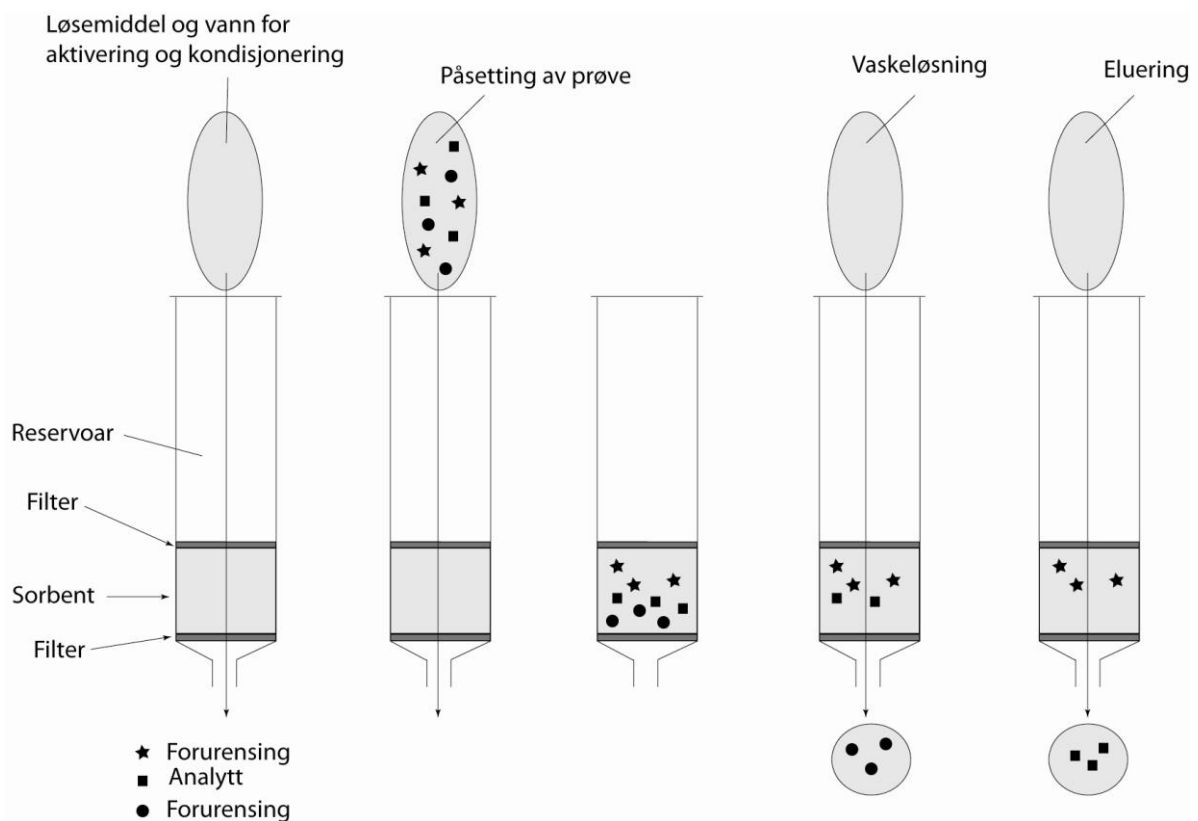
Per i dag kan non-respons kun oppdages ved klinisk observasjon, det vil si at graden av respons er ukjent inntil en kardiovaskulær hendelse eventuelt inntreffer. Det optimale vil være å kunne avdekke non-respons på et tidlig tidspunkt før eventuell stent-trombose oppstår. I den grad endringer på metabolismenivå ligger til grunn for non-respons vil gode analysemetoder være særdeles viktig for å avdekke non-respons. En analysemetode som høyst sannsynlig kan muliggjøre dette er en HPLC-MS/MS metode. Kvantifisering av klopidogrel selv og noen av metabolittene vil gjøre det mulig å avdekke manglende omdanning til aktiv metabolitt og dermed suboptimal platehemmende effekt ved bruk av standarddosering av klopidogrel. Prøveopparbeidelse i form av proteinutfelling i serum og utvikling av en ekstraksjonsprosedyre vil være nødvendig før analyse av serumprøver ved hjelp av High Performance Liquid Chromatography tandem massespektrometri (HPLC-MS/MS).

1.5 LEGEMIDDELANALYSE I BIOLOGISK MATERIALE

Ved analyse av legemidler i biologisk materiale som for eksempel blod, vil prøveopparbeidelse ofte være nødvendig. Hensikten med prøveopparbeidelsen er å fjerne eventuelle forurensninger og interfererende forbindelser i prøven. Prøveopparbeidelsen gjør det også mulig å oppkonsentrere analytten dersom konsentrasjonen er for lav til å kunne detekteres. [15] De vanligste teknikkene for prøveopparbeidelse er liquid phase micro extraction (LPME), væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE). I denne oppgaven er det kun benyttet fast-fase ekstraksjon, og dermed omtales kun denne metoden for prøveopparbeidelse videre.

1.5.1 Fast-fase ekstraksjon (SPE)

Ved SPE retarderes analyttene på en sorbent ved at prøveløsningen suges gjennom sorbenten. Analyttene retarderes ved at det oppstår sterkere interaksjoner mellom funksjonelle grupper på overflaten av sorbenten og analytten enn det er mellom analytten og væsken prøven er løst i. Eventuelle forurensninger vaskes ut med en egnet vaskeløsning, og til slutt elueres analyttene ut av sorbenten med en egnet elueringsløsning. Dersom det fortsatt er forurensninger til stede, vil disse være igjen i sorbenten. [15]



Figur 5: Generell prosedyre for SPE. Figuren er brukt etter tillatelse fra Terje Vasskog

Det er flere ulike typer sorbenter tilgjengelig, for eksempel omvendt-fase sorbenter, ionebyttersorbenter og normalfase sorbenter. I denne oppgaven ble det benyttet Sep-pak C₁₈-kolonner som inneholder omvendt-fase sorbenter. Sorbenten består av silikapartikler med C₁₈-kjeder bundet til silanolgruppene. Dette pakkematerialet er svært likt det som benyttes i en HPLC-kolonne av C₁₈-typen, hvor hovedforskjellen er partikkelstørrelsen til pakkematerialet. I HPLC-kolonnene er alle partiklene like store og partikkelstørrelse mellom 3 og 10 µm kan velges. Partikkelstørrelsen på stasjonærfasen i en SPE-kolonne er 40-50 µm. SPE-kolonnene må ha en større partikkelstørrelse slik at biologiske væsker som serum og plasma kan suges gjennom kolonnen. Dersom partiklene hadde vært mindre ville mottrykket i kolonnen gjort det vanskelig å suge gjennom de biologiske væskene. [15]

1.5.2 Utfelling av proteiner (PP) fra serum

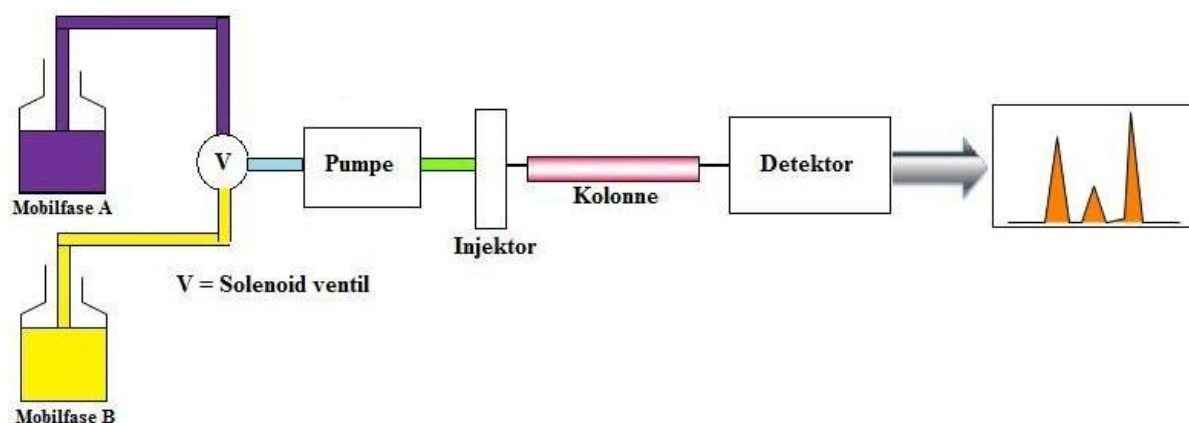
Plasma og serum er biologiske matrikser som er komplekse blandinger av endogene forbindelser som proteiner, salter lipider etc. Disse endogene forbindelsene kan interferere med analyttene under separasjons- og deteksjonsprosessen. Proteinutfelling (Protein Precipitation, PP) er en vanlig prosedyre som benyttes for å felle ut proteinene ved å tilsette et organisk løsemiddel, en syre eller et salt. På denne måten kan en fjerne opp til 98 % av proteinene i plasma. Teknikker for PP kan benyttes på blodprøver for rensing av prøven alene eller som forbehandling dersom den brukes sammen med andre ekstraksjonsteknikker. Det er vanlig å benytte sentrifugering for isolering av filtratet, hvor supernatanten kan injiseres direkte i analyseapparatet, benyttes videre i en ekstraksjonsprosedyre eller for avdamping av løsemidlet. I litteraturen er det benyttet både acetonitril og 10 % trikloreddiksyre (TCA) løsninger for PP. [16] Ved utfelling av proteiner denatureres proteinene og proteinenes kapasitet til å binde legemidler ødelegges. [17]

1.6 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

Kromatografiske analyseteknikker benyttes for å separere ulike forbindelser i en prøve. Forbindelsene i prøven separeres ved at de fordeler seg mellom en stillestående stasjonær fase og en mobilfase som er i bevegelse. [15]

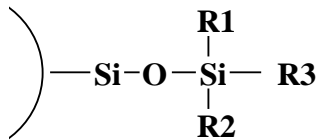
HPLC er den mest brukte formen for væskerkromatografi og benyttes ofte for å bestemme innholdet av virkestoff i farmasøytiske preparater og innholdet av virkestoff og metabolitter i biologiske materialer som blod, urin etc. Forkortelsen HP sto i utgangspunktet for "High Pressure" grunnet det høye mottrykket over kolonnen, men ble senere endret til "High Performance". Ved væskerkromatografi pakkes stasjonærfasen i en kolonne, og mobilfasen er en væske som pumpes gjennom kolonnen med en bestemt hastighet. Forbindelsene som retarderes av stasjonærfasen vil transporteres langsommere gjennom kolonnen enn mobilfasen. Dersom det er flere forbindelser til stede i prøven som retarderes ulikt av stasjonærfasen, vil forbindelsene separeres ved at de kommer ut av kolonnen ved ulike tidspunkter. [15]

Prøveløsningen injiseres i strømmen av mobilfase ved hjelp av en injektor, transporteres gjennom kolonnen og påvises av en detektor ved utgangen av kolonnen. I et kromatogram registreres detektorresponsen som funksjon av tid etter injeksjonen, hvor den forbindelsen som retarderes mest av stasjonærfasen og har lengst opphold på kolonnen vil få lengst retensjonstid. [15]



Figur 6: Sjematisk oppbygning av en HPLC. Figuren er brukt og modifisert etter tillatelse fra Einar Jensen

Den vanligste separasjonsteknikken innenfor væskrokromatografi er omvendt-fase kromatografi, hvor stasjonærfasen er hydrofob og mobilfasen som oftest består av vann blandet med acetonitril eller metanol. I tillegg kan det benyttes buffer, syre eller base for å regulere pH. Stasjonærfasen består av silikapartikler hvor hydrofobe grupper er bundet til silanolgruppene. [15]



Figur 7: Generell oppbygging av stasjonærfasen i en omvendt-fase kolonne

R_1 og R_2 er vanligvis CH_3 , mens R_3 kan være alkylkjeder med ulik lengde, aminopropylkjeder eller cyanopropylkjeder. Av disse er det alkylkjeder med 18 karbonatomer (C_{18}) som er den mest brukte stasjonærfasen. Silikabaserte stasjonærfaser kan kun benyttes sammen med mobilfaser som har en pH i området 2-8. [15]

Retensjonen på C_{18} -kolonner vil hovedsakelig skyldes at det skjer en hydrofob interaksjon mellom den upolare delen av analytten og C_{18} -kjeden. De viktigste kreftene som er involvert i denne typen interaksjoner er *van der Waals-krefter*. Retensjonen til analyttene vil være større jo større den upolare delen av molekylet er. Dette skyldes at det blir et større kontaktareal mellom analytten og C_{18} -liganden jo større den upolare delen av molekylet er. Dersom det er ioniserbare grupper til stede i molekylet, vil retensjonen avta med økende ionisering. [15]

1.6.1 Kromatografiske begreper

1.6.1.1 Retensjonstid (t_R)

Retensjonstiden (t_R) til en forbindelse er den tiden det tar fra prøven injiseres på kolonnen og til det oppnås maksimal detektorrespons. Retensjonstiden er karakteristisk for en forbindelse, og kan derfor benyttes som hjelp til identifikasjon. For å oppnå separasjon av analyttene må retensjonstidene være tilstrekkelig forskjellige og bredden av toppene tilstrekkelig smale.

Retensjonstiden kan endres ved å endre mobilfasesammensetningen, jo sterkere mobilfasen er, jo kortere vil retensjonstiden være.

1.6.1.2 Kapasitetsfaktor (k')

Kapasitetsfaktoren (k') kalles også retensjonsfaktoren, og den forteller hvor stor retensjonen i stasjonærfasen er.

$$k' = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1)$$

der t_0 er tiden det tar før mobilfasen eluerer ut av kolonnen og t_R er retensjonstiden til analytten.

1.6.1.3 Selektivitet (α)

Separasjonsfaktoren angir hvor godt en forbindelse separeres fra en annen, og uttrykker separasjonens selektivitet. Separasjonsfaktoren beregnes ved

$$\alpha = k'_2 / k'_1 \quad (2)$$

hvor k_2 er retensjonsfaktoren til den analytten som har lengst retensjonstid, og k_1 er retensjonsfaktoren til den analytten som har kortest retensjonstid. Separasjonen vil være mer selektiv jo større α er.

1.6.1.4 Antall teoretiske plater (N)

Antall teoretiske plater (N) er et uttrykk for båndbredde, og uttrykker kolonnens evne til å lage smale topper. N beregnes ut fra

$$N = 5,54 (t_R / t_{w\ 0,5h})^2 \quad (3)$$

hvor t_R er retensjonstiden og $t_{w\ 0,5h}$ er toppens bredde målt ved toppens halve høyde. N blir større jo smalere toppene er i forhold til retensjonstiden, og jo større N er, jo mer effektiv er kolonnen til å gi smale topper.

1.6.1.5 Høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H)

Høydeekvivalenten til en teoretisk plate (H) angir hvor effektiv hver lengdeenhet av kolonnen er til å gi smale topper, og uttrykker dermed kolonnens effektivitet. H uttrykkes med

$$H = L / N \quad (4)$$

hvor L er lengden på kolonnen og N er antall teoretiske plater. H gir en muligheten til å sammenligne effektiviteten til kolonner med ulik lengde. Dersom en har en liten H- verdi vil det si at kolonnen gir smale topper.

1.6.1.6 Oppløsningsevnen (R_S)

Oppløsningsevnen (R_S) er et kvantitativt uttrykk for hvor godt toppene i et kromatogram separeres. Forholdet mellom avstanden mellom toppene og toppens bredde, uttrykkes av oppløsningsevnen. Dersom oppløsningsevnen er større enn 1,5 vil en få grunnlinjeseparasjon, hvor den første toppen går ned til grunnlinjen før neste topp i kromatogrammet registreres. Dersom oppløsningsevnen er mindre enn 1,5 vil en få overlappende topper, og jo mindre oppløsningsevnen er, jo mer vil toppene overlappe.

Oppløsningsevnen kan påvirkes av retensjonsfaktoren (k'), antall teoretiske plater (N) og separasjonsfaktoren (α):

$$R_S = \frac{1}{4} (\alpha - 1) \sqrt{N} [k' / (k' + 1)] \quad (5)$$

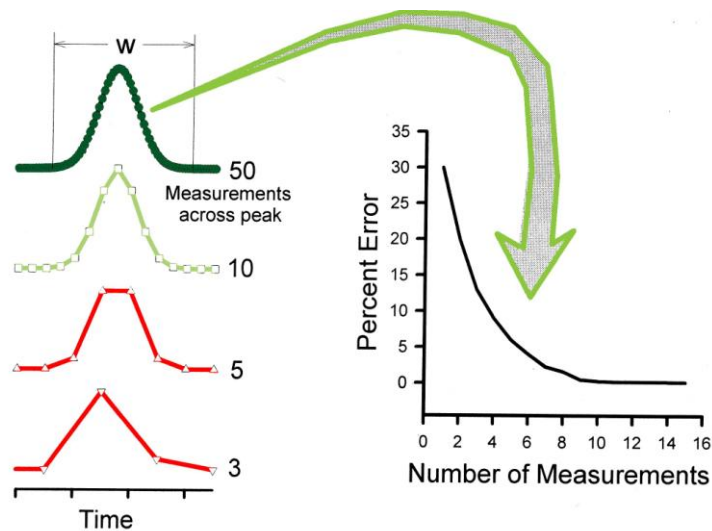
Ved å redusere styrken på mobilfasen, kan retensjonsfaktoren økes. Selektiviteten kan endres ved å endre mobilfasesammensetning, pH i mobilfasen eller ved å endre stasjonærfasen. Et lavt antall teoretiske plater gir brede topper, så ved å bytte kolonne kan antall teoretiske plater økes og bredden på toppene reduseres. [15]

1.6.2 Kvantitative analyser

Ved kvantitative analyser lages det standardløsninger som inneholder en konstant mengde internstandard og ulike konsentrasjoner analytt. Standardløsningene analyseres, og standardkurven settes opp ved å plote forholdet mellom analyttens toppareal og internstandardens toppareal mot konsentrasjon av analytt i tillagede standardløsninger. Toppen for internstandard vil ha et relativt likt areal, mens topparealet for analytten vil øke med økende konsentrasjon av analytt. Konsentrasjon av analytt i en prøveløsning vil kunne bestemmes ved å tilsette lik mengde internstandard til prøven som det ble tilsatt til standardløsningene. Da vil en kunne bruke det beregnede forholdstallet mellom topparealet til analytten og internstandardens for å lese av konsentrasjon av analytt i prøven. [15]

1.6.3 Antall målinger langs toppen i kromatogrammet

For å unngå at det oppstår målefeil for toppen i kromatogrammet bør det utføres et tilstrekkelig antall MS-scan langs toppen. Prosentandelen feil i målingen reduseres ettersom antall MS-scan langs toppen øker, og 10-12 scan langs toppen vil oftest være tilstrekkelig. Ut fra figuren nedenfor kan en se at prosent feil begynner å flate ut mot null etter et slikt antall målinger. [18]



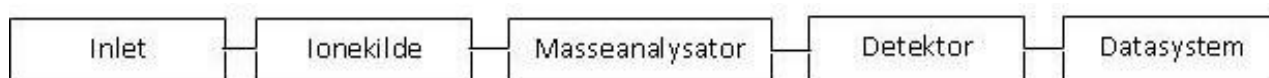
Figur 8: Grad av feil i prosent som funksjon av antall målepunkter langs toppen. Figuren er brukt etter tillatelse fra Einar Jensen

1.7 MASSESPEKTROMETRI

1.7.1 Generelt

Massespektrometri (MS) kan brukes til å identifisere og kvantifisere ulike forbindelser, og er i kombinasjon med kromatografi et veldig nyttig verktøy for legemiddelanalyse.

Et massespektrometer er bygd opp slik som angitt i skissen nedenfor, hvor innføring av prøve skjer via HPLC, Gas Chromatography (GC), probe eller direkte ved en sprøyteinjeksjon. Først ioniseres og fragmenteres forbindelsene i ionekilden, videre separeres ionene etter deres masse til ladning ratio (m/z) i masseanalysatoren, detekteres i detektoren, og til slutt behandles informasjonen i et datasystem. [15]



Figur 9: Skjematisk oversikt over oppbygningen av et massespektrometer

1.7.2 Ionekilder

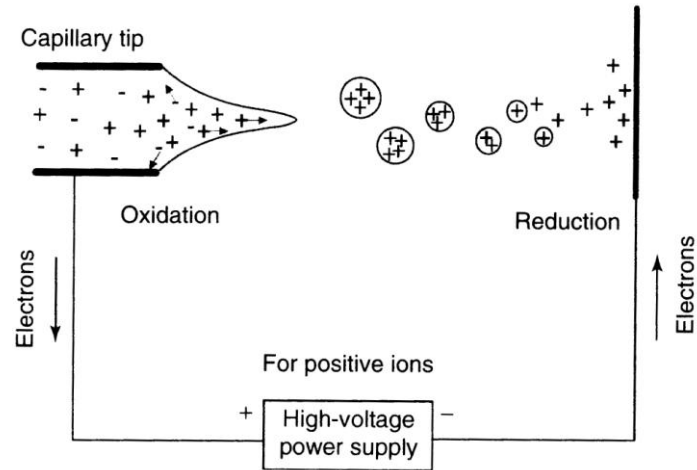
I ionekilden omdannes nøytrale molekyler til ioner. Det finnes et antall ulike ionekilder, hvor elektronionisasjon (EI) er den klassiske. Men denne ionekilden forutsetter at molekylene ikke er for polare eller har for høy molekylvekt, og brukes oftest sammen med GC.

Ved elektronionisasjon (EI) og elektroprayionisasjon (ESI) foregår ioniseringen ved hjelp av en spenning, mens ved kjemisk ionisasjon (CI) og atmosfæretrykk-kjemisk-ionisasjon (APCI) tilføres en reagensgass til ionekilden, hvor gassen ioniseres og videre ioniserer analyttene. I denne oppgaven ble analyttene analysert ved hjelp av elektroprayionisering i positiv mode, og dermed omtales kun denne videre.

1.7.2.1 Elektroprayionisasjon:

ESI foregår under atmosfærisk trykk, og benyttes for analyse av forbindelser i væskefase. Prøveløsningen presses gjennom et tynt metallkapillær, og mellom enden av kapillæret og en motelektrode er det en spenning på 2-6 kV slik at det dannes et elektrisk felt. Denne spenningen fører til at det dannes en aerosol av høyt ladede dråper. Dannelsen av aerosol lettes ved å benytte en nebuliser N_2 -gass som flyter rundt kapillæret. Størrelsen på de ladede dråpene blir mindre og mindre etter hvert som en varm desolveringsgass damper bort løsemidlene. Når dråpene har oppnådd en tilstrekkelig ladningstetthet, vil ionene i prøven skilles ut fra overflaten til dråpene og ionene er da overført fra væske til gassfase.

Prøveionene er tyngre enn løsemidlet og gassmolekylene, og fraktes dermed videre inn i masseanalysatoren hvor deres m/z ratio måles, mens løsemidlet og gassmolekylene pumpes bort. [19, 20]

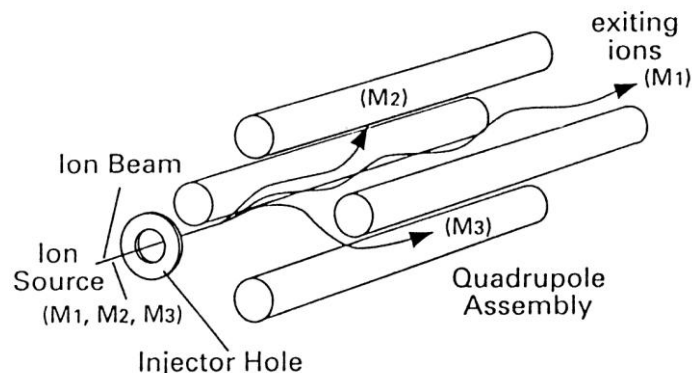


Figur 10: Skjematisk oversikt over den elektrokjemiske prosessen som skjer ved ESI [19]

1.7.3 Masseseparatorer

Etter ionisering, fraktes fragmentionene inn i masseanalysatoren hvor de separeres etter deres m/z -ratioer. Det finnes mange typer masseseparatorer, f.eks. magnetisk sektor, quadropol, Time of flight (TOF) etc. I denne oppgaven ble det brukt en quadropol masseanalysator og dermed omtales kun denne videre.

1.7.3.1 Quadropol masseanalysator



Figur 11: Skjematisk tegning av en quadropol masseanalysator [20]

En quadropol masseanalysator består av fire sylindriske, eller ideelt sett hyperbolske, staver som er arrangert direkte parallelt til hverandre. Motsatte staver har samme polaritet, mens tilgrensende staver har motsatt polaritet og det dannes på denne måten et elektrisk felt mellom

stavene. Ionene som dannes i ionekilden vil kun ha en liten akselerasjonsspenning og dermed en relativt lav energi. Når de kommer inn i det elektriske feltet i quadropolen vil ionene vibrere, og ved en bestemt radiofrekvens vil ioner med en bestemt masse ha en stabil vibrasjon slik at de kan fortsette rett frem mellom stavene og nå detektoren. Under disse omstendighetene vil alle andre masser som ikke har en stabil vibrering gå tapt ved at de kolliderer med stavene i quadropolen. På denne måten oppnår man masseseparasjon etter ionenes m/z ratio før de detekteres. [19, 20]

1.7.4 Deteksjon

Etter at ionene har passert gjennom masseanalysatoren, detekteres og omgjøres de til et signal i detektoren. Detektoren danner en elektrisk strøm av ionene som er proporsjonal til mengden ioner. Proporsjonaliteten vil kun gjelde innenfor et visst område da responsen vil begynne å flate ut ettersom mengden ioner blir for høy. Detektorer som består av fotografiske plater og Faraday cup, måler en direkte ladningsstrøm som dannes når et ion treffer en overflate og nøytraliseres. Elektronmultiplikatorer eller electro-optical ionedetektorer er basert på kinetisk energioverføring og vil i tillegg forsterke intensiteten av signalet ved hjelp av en kaskadeeffekt. [19]

1.7.5 Singel MS

Et massespektrometer kan benyttes i ulike modus avhengig av hvordan quadropolene og kollisjonscella brukes. Ved singel MS benyttes kun den ene quadropolen i massespektrometret.

1.7.5.1 Fullscan

I de fleste tilfeller utføres det et fullscan initielt for å tilegne seg så mye strukturell informasjon om forbindelsen som mulig. Når det utføres et fullscan brukes kun den ene quadropolen i scan mode. Da slippes alle ionene som produseres i ionekilden gjennom quadropolen og detekteres. [20]

1.7.5.2 SIR

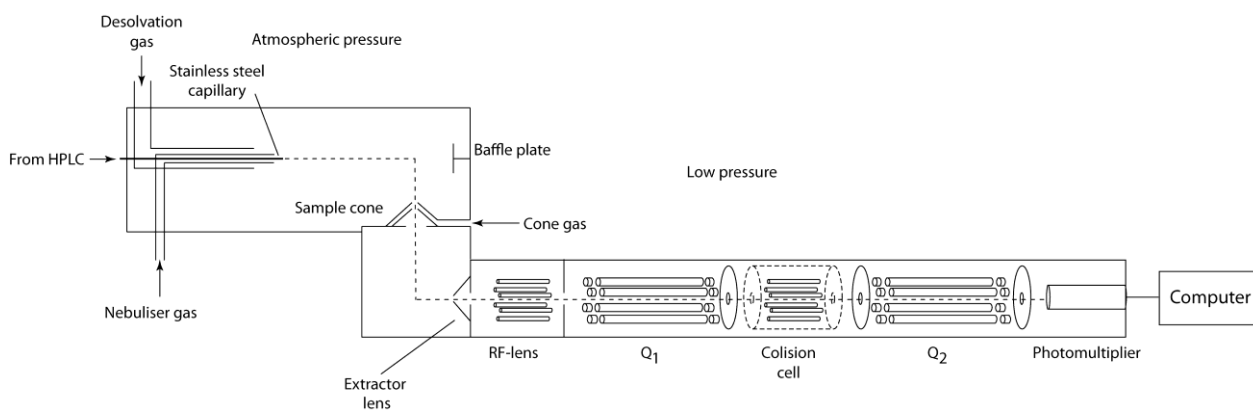
Selected ion recording (SIR) brukes til kvantitative analyser av en kjent analytt. Når man utfører SIR må man først identifisere molekylionet og fragmentioner, og masseanalysatoren vil da monitorere de spesifiserte ionene ved å scanne ionene vekselvis. Denne teknikken vil være mer sensitiv enn et fullscan da det kun fokuseres på de utvalgte ionene, og ikke scannes

over et helt m/z område. [20] Sammenlignet med fullscan senkes minste detekterbare mengde (LOD) og minste kvantifiserbare mengde (LOQ) ved bruk av SIR.

1.7.6 MS/MS

Tandem massespektrometri (MS/MS) kan utføres ved å koble sammen to masseanalytorene i en serie og plassere en kollisjonscelle mellom disse to analysatorene. [20]

Kollisjonscella består av et antall staver, hvor disse kan være arrangert som en quadropol, heksapol eller oktapol. Den inerte gassen som er til stede er argon, helium eller xenon, hvor denne gassen, med tilstrekkelig energi, vil bombardere ethvert analyttion som har den molekylmassen som er utvalgt av den første analysatoren, og forårsake en fragmentering av foreldreionet. [20]



Figur 12: Skjematisk tegning av Micromass Quattro-LC massespektrometer. Figuren er brukt etter tillatelse fra Terje Vasskog

1.7.6.1 Produktionscan

Når det utføres et produksjonscan (også kalt datterionscan), benyttes den første analysatoren til å isolere et foreldreion, $[M+H]^+$. Foreldreionet sendes inn i kollisjonscella, hvor dette kolliderer med den inerte gassen, fragmenteres og danner produksjoner. Alle fragmentene som blir dannet i kollisjonscella transporteres videre til den siste analysatoren. Dersom denne er i scan mode vil alle fragmentene fra $[M+H]^+$ registres og vi får presentert et produksjonsspektrum. Siden det kun er ioner fra det valgte foreldreionet som sendes videre fra den første analysatoren, vil denne metoden kun gi fragmenter fra foreldreionet. [20] Dette er en fordel dersom en arbeider med prøver der flere substanser kommer inn i ionekilden samtidig.

1.7.6.2 MRM

Ved multiple reaction monitoring (MRM) låses den første masseanalysatoren på m/z verdien for foreldreionet, og den andre masseanalysatoren låses på m/z verdien for ett eller flere datterioner. Denne analyseformen skaffer altså ingen ny informasjon om en forbindelse, men i stedet kan den brukes for å bekrefte om en bestemt forbindelse er til stede eller ikke. Dette vil være en meget spesifikk kvantitativ metode for påvisning av en bestemt analytt da det vil være veldig få andre forbindelser som har en bestemt m/z verdi for foreldreionet, og som fragmenteres til bestemte produksjoner med bestemte m/z verdier. Unntaket vil eventuelt være noen relaterte isomerer. [20]

1.8 INTERNSTANDARD

Internstandard benyttes for å oppnå presisjon og nøyaktighet. Internstandarden tilsettes prøven i en kjent mengde før prøveopparbeidelsen, og holdes konstant i hver prøve. På denne måten vil internstandard korrigere for tilfeldige feil som kan skje under prøveopparbeidelsen. Tilfeldige feil kan være tap av analytt og internstandard korrigerer for dette ved at det vil være lik mengde internstandard og analytt som eventuelt går tapt. For at internstandard skal korrigere best mulig for analytten, bør den ha lignende struktur som analyttene, oppføre seg relativt likt som analytten under prøveopparbeidelsen, være fullstendig separert fra analyttene i kromatografien, ha lik detektorrespons som analytten og ikke være naturlig til stede i prøven. [15, 21] Det kan ofte være ugunstig å bruke andre legemidler som internstandard da disse kan være til stede i en biologisk prøve dersom pasienten også bruker dette legemidlet.

1.9 FORMÅL

Det overordnede formålet med denne oppgaven var å utvikle en metode for å identifisere non-respondere av klopidogrel, ut fra teorien om at genetiske variasjoner i hepatisk omdannelse til aktiv metabolitt ligger til grunn for manglende respons på behandlingen. Målet var å utvikle en HPLC-MS/MS basert analysemetode for kvantitativ analyse av klopidogrel og klopidogrelmetabolitter i serum.

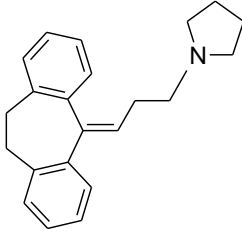
Spesifikke delmål for arbeidet var:

1. Testing av betingelser i MS ionekilde for å få optimal produksjon av $(M+H)^+$ for legemiddel og metabolitter.
2. Ta opp produksjon scan av legemidlene og metabolittene for å bruke dette til å utvikle MRM basert HPLC-MS/MS analyse.
3. Valg og testing av HPLC- kolonne og mobilfaser for separasjon av legemiddel og metabolitter.
4. Benytte informasjon fra pkt. 1, 2 og 3 til å utvikle HPLC-MS/MS basert kvantitativ analyse av klopidogrel, tiklopidin, og metabolitter av disse. Definere limit of detection (LOD) og limit of quantification (LOQ).
5. Teste ulike metoder for ekstraksjon og rensing av analyttene i opparbeidede blodprøver.
6. Validering av metode.
7. Bruk av metoden til analyse av reelle blodprøver fra pasienter som viser nonrespons.

2 METODE

2.1 INTERNSTANDARD

Som internstandard ble det benyttet en forbindelse donert av H. Lundbeck AS kalt N-7084.



Figur 13: Strukturformel for N-7084.

2.2 TILLAGING AV LØSNINGER

Tablettløsninger av klopidogrel og tiklopidin ble brukt i de innledende forsøkene på HPLC og MS for å erverve kunnskap om forbindelsene. Tablettprøver sammen med internstandard ble brukt i starten for utvikling av metoder på HPLC-MS og HPLC-MS/MS. Det ble senere brukt innkjøpte renstoffer for kvantitative analyser og SPE.

2.2.1 Bruksløsninger fra tabletter

Tablettprøvene ble laget ved å knuse to tabletter fra hvert legemiddel i morter, hvor to tabletter Plavix® inneholder 150 mg klopidogrel og 2 tabletter Ticlid® inneholder 500 mg tiklopidin. Tablettpulveret ble overført til et plastrør, morteren ble skylt med metanol og det ble totalt tilsatt 2 ml metanol. Tablettprøven for klopidogrel ble sentrifugert ved 3000 rpm i 30 minutter, mens tablettprøven for tiklopidin ble sentrifugert ved 3000 rpm i 90 minutter. Videre fortynning ble gjort med Milli-Q vann:metanol:maursyre 50:50:0,1 (v/v/v), slik at klopidogrelløsningen hadde en anslått konsentrasjon på 3750 ng ml^{-1} dersom utbyttet fra tablettpulveret var 100 %. Tiklopidinløsningen ble først anslått til å ha en konsentrasjon på ca $12\,500 \text{ ng/ml}$, men etter senere sammenligning med resultater fra analyse av renstoff kan konsentrasjonen anslås til å være ca 2000 ng/ml^{-1} . Nøyaktig konsentrasjon var ikke avgjørende da løsningene kun ble benyttet til innledende utvikling av metoder.

Det ble også laget tablettprøver der Milli-Q vann:acetonitril:maursyre 50:50:0,1 (v/v/v) ble brukt som løsemiddel.

Tabell 1: Konsentrasjon av legemiddel i tabletløsning

Legemiddel	Antatt konsentrasjon
Plavix® 75 mg	3750 ng ml ⁻¹
Ticlid® 250 mg	12500 ng ml ⁻¹ (senere anslått 2000 ng ml ⁻¹)

2.2.2 Bruksløsninger fra renstoff

Etter at betingelsene for MS, MS/MS og HPLC-MS/MS var fastsatt ved bruk av tabletløsninger, ble renstoff benyttet for videre analyse. Det ble laget stamløsninger for de ulike forbindelsene med konsentrasjoner lik de som er angitt i tabellen nedenfor.

Stamløsningene ble laget i metanol, og oppbevart i fryseboks ved -20 °C.

Tabell 2: Konsentrasjoner av stamløsninger (salter og rene forbindelser)

Forbindelse	Konsentrasjon av salt (ng ml ⁻¹)	Konsentrasjon av ren forbindelse (ng ml ⁻¹)
Klopidogrel (H ₂ SO ₄)	1000000	766000
Tiklopidin (HCl)	4020000	3530000
N-7084 (HCl)	112040	99873

Det ble videre laget ulike bruksløsninger ut fra stamløsningene, og metanol ble brukt til fortynning. Bruksløsningene ble lagret i kjøleskap ved 4 °C i en uke før nye ble laget. Disse bruksløsningene ble brukt til utvikling av standardkurve, fastsettelse av betingelser for SPE og spiking av serum.

2.3 FAST-FASE EKSTRAKSJON AV RENSTOFF I VANDIGE PRØVER

Det ble benyttet Sep-Pak C₁₈ fast-fase kolonner. For kondisjonering av kolonnen ble det benyttet 2 ml metanol og deretter 2 ml vann:metanol 95:5 (v/v). Prøven inneholdende klopidogrel 766 ng ml⁻¹, tiklopidin 2647,5 ng ml⁻¹ og N-7084 2500 ng ml⁻¹ i vann:metanol 95:5 (v/v) ble satt på kolonnen. Det første som ble gjort i metodeutviklingen var å teste 5 fraksjoner med ulike sammensetninger av vann og metanol. Det ble testet vann:metanol i forholdet 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, og 20:80 (v/v), hvor volumet av testløsningene var 1 ml. De ble testet i den rekkefølgen som angis her, og til slutt ble kolonnen sugd tørr ved eluering med vann:metanol 20:80. Eluatene ble analysert med den utviklede MRM- metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4.1).

Vann:metanol 50:50 (v/v) ble ansett som tilstrekkelig for å vaske ut eventuelle forurensninger under fast-fase ekstraksjonen, og ble brukt videre som en vaskeløsning. For eluering av analyttene ble det testet 2 x 1 ml, og senere 4 x 1 ml metanol. Dette var ikke tilstrekkelig for å eluere ut internstandard, og det ble videre testet 4ml + 1 ml + 1 ml + 1 ml metanol for eluering.

8 x 1 ml metanol inneholdende 0,05 M saltsyre (HCl) ble testet som elueringsmiddel. Eluatene ble analysert ved hjelp av den utviklede HPLC-MS/MS metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4). Etter analyse av eluatene ble løsemidlene dampet av under en svak strøm av nitrogen ved 50 °C. De avdampede eluatene ble reoppløst i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann, blandet ved hjelp av vortex-mikser og analysert vha. den utviklede MRM-metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4.1).

5 x 1 ml metanol inneholdende 0,01 M HCl ble også testet som elueringsmiddel, hvor eluatene ble bearbeidet på samme måte som eluatene fra 8 x 1 ml metanol (0,05 M HCl).

2.4 FAST-FASE EKSTRAKSJON AV RENSTOFF FRA SERUM

I utviklingen av ekstraksjonsmetode for analyttene fra serum, ble det benyttet serum tilsatt klopido-rel, tiklopidin og internstandard. I starten av metodeutviklingen inneholdt serumprøven følgende konsentrasjoner av analyttene: 766 ng ml⁻¹ klopido-rel, 2647,5 ng ml⁻¹ tiklopidin og 2500 ng ml⁻¹ N-7084. Det totale prøvevolumet var 1 ml.

Det ble benyttet Sep-Pak C₁₈ SPE-kolonner for SPE av serumprøver. Det første som ble gjort i metodeutviklingen, var å ekstrahere prøven uten å felle ut proteinene i serum først. For kondisjonering ble det benyttet 2 ml metanol og 2 ml vann:metanol 95:5 (v/v). Prøven ble satt på kolonnen, og som vaskeløsning ble det benyttet vann:metanol 50:50 (v/v). For eluering ble det benyttet 4 x 1 ml metanol (0,01 M HCl). Eluatene ble dampet til tørrhet under en svak strøm av nitrogen ved 50 °C, reoppløst i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann, blandet ved hjelp av vortex-mikser og analysert vha. den utviklede MRM- metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4.1).

2.4.1 Utfelling av proteiner i serum med kald acetonitril

Da SPE alene ikke var tilstrekkelig for å fjerne proteinene fra serum, ble utfelling av proteinene i serum før SPE ansett som nødvendig. Kjølenskapskald acetonitril (4 °C) ble tilsatt i et 1:1 (v/v) forhold til serum i prøven. Prøven ble sentrifugert ved 13 000 rpm i 3 x 5 minutter. Det ble utført 2 paralleller, hvor supernatanten fra den ene parallellen ble analysert vha. den utviklede MRM- metoden (se pkt. 2.6.4.1), og supernatanten for den andre parallellen ble ekstrahert ved SPE. Ekstraksjonsprosedyren som ble benyttet var den angitt ovenfor (se pkt 2.4).

Videre ble det utført SPE for en serie serumprøver med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.4 (0,38 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel). Det ble laget to paralleller av hver prøve. Alle prøvene ble sentrifugert umiddelbart etter tilsetning av kjøleskapskald acetonitril ved 13 000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble tatt ut, og for den ene parallellen ble 50 µl av supernatanten overført til en vial for HPLC-MS/MS analyse. Det resterende av supernatanten ble dampet til tørrhet under en svak strøm av nitrogen ved 50 °C, reoppløst i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann, blandet ved bruk av vortex-mikser og analysert vha. den utviklede MRM- metoden (se pkt. 2.6.4.1). For den andre parallellen ble det utført SPE, og som elueringsmiddel ble det benyttet 4 x 1 ml metanol inneholdende 0,01 M HCl. Eluatene ble dampet til tørrhet under en svak strøm av nitrogen ved 50 °C, reoppløst i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann, blandet ved bruk av vortex-mikser og analysert vha. den utviklede MRM- metoden (se pkt. 2.6.4.1).

Videre ble det testet om et høyere volum enn 4 ml metanol (0,01 M HCl) var nødvendig for å få eluert ut analyttene. Det ble benyttet en prøve som inneholdt 0,38 ng ml⁻¹ klopidogrel, 0,44 ng ml⁻¹ tiklopidin og 250 ng ml⁻¹ N-7084, og utført SPE hvor 3 x 4 ml metanol som inneholdt 0,01 M HCl ble benyttet som elueringsmiddel. Eluatene ble dampet til tørrhet, reoppløst og analysert ved hjelp av den utviklede MRM- metoden (se pkt 2.6.4.1).

Videre ble det utført SPE for en serie serumprøver med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 (0,0077 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel). Det ble utført to paralleller av hver prøve. Alle prøvene ble sentrifugert umiddelbart etter tilsetning av kald acetonitril ved 13 000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten fra den ene parallellen ble dampet til tørrhet, reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1, blandet ved bruk av vortex-mikser og analysert ved hjelp av den utviklede MRM- metoden som beskrevet i pkt.

2.6.4.1. Supernatanten fra den andre parallellen ble rensert videre vha. SPE, og 4 ml metanol inneholdende 0,01 M HCl ble benyttet som elueringsmiddel. Eluatene fra SPE ble dampet til tørrhet under en svak strøm av nitrogen ved 50 °C, reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1, blandet ved bruk av vortex-mikser og analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (se pkt. 2.6.4.1).

Metanol som inneholdt 0,1 % maursyre ble også testet som elueringsmiddel. Ved SPE av en serumprøve som inneholdt 0,38 ng ml⁻¹ klopidogrel, 0,44 ng ml⁻¹ tiklopidin og 250 ng ml⁻¹ N-7084 ble det eluert med 3 x 4 ml metanol som inneholdt 0,1 % maursyre. Eluatene ble dampet til tørrhet, reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1 og analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (se pkt. 2.6.4.1).

Videre ble det gjort et forsøk på å lage en ny standardkurve med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 (0,0077 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel). Alle prøvene ble sentrifugert umiddelbart etter tilsetning av kald acetonitril ved 13 000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Det ble utført SPE for supernatantene hvor 4 ml metanol som inneholdt 0,1 % maursyre ble benyttet for eluering. Eluatene ble dampet til tørrhet, reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1 og analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4.1).

2.4.2 Utfelling av proteiner i serum med TCA

10 % TCA løst i Milli-Q vann ble testet for utfelling av proteiner. Serumprøver med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 (0,0077 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel) ble benyttet. 10 % TCA løst i Milli-Q vann ble tilsatt i forholdet 1:1 (v/v) til serum. Alle prøvene ble sentrifugert umiddelbart etter tilsetning av TCA ved 13 000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Supernatantene ble satt i kjøleskap i 2 timer, SPE ble utført og 4 ml metanol som inneholdt 0,1 % maursyre ble benyttet for eluering. Eluatene ble sentrifugert på 13 000 rpm ved 4 °C i 10 minutter. Supernatanten ble dampet til tørrhet, reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1. Vialene ble satt i kjøleskap over natt, og sentrifugert ved 3 000 rpm i 10 minutter. Supernatantene ble overført til nye vialer og analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (som beskrevet i pkt. 2.6.4.1).

2.5 UTVIKLING AV VÆSKEKROMATOGRAFISK METODE

Det ble benyttet en Waters XBridge™ C18 2,1 x 150 mm kolonne med 3,5 µm partikler (18,88 % carbon load, 146 Å pore diameter, 0,77 cm³/g pore volum og 189 m²/g overflateareal). XBridge ble valgt som kolonne da denne typen kolonner markedsføres med å gi robuste metoder over hele pH-området, fleksibilitet og har lang levetid.

Som mobilfase ble det benyttet ulike sammensetninger av mobilfasekomponent A og mobilfasekomponent B. Mobilfase A bestod av Milli-Q vann tilsatt 0,1 % maursyre, og mobilfase B bestod av 90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre.

2.5.1 Utvikling av isokratisk metode fra tablettprøver

For å fastsette de kromatografiske betingelsene til klopidogrel og tiklopidin ble det benyttet løsninger laget av tablettprøver. Det første som ble gjort i metodeutviklingen for væskechromatografi var å finne ut om isokratisk eluering var egnet for å separere substansene innenfor en akseptabel analysetid. Tablettprøver av klopidogrel og tiklopidin ble blandet i en vial og plassert i HPLC autosamplers, og eluert med en trinnvis reduksjon av andelen av mobilfase B.

Tabell 3: Sammensetning av mobilfase A og B ved isokratisk eluering

Andel av mobilfase A (Milli-Q vann, 0,1 % maursyre)	Andel av mobilfase B (90% acetonitril, 10 % milli-Q vann, 0,1% maursyre)
30	70
40	60
50	50

Mobilfasesammensetning med 40 % av mobilfase A og 60 % av mobilfase B ble anvendt videre.

2.5.2 Kromatografi av renstoff og internstandard i vandige prøver

For fastsettelse av de kromatografiske betingelsene for internstandard N-7084 ble det benyttet bruksløsninger av rent stoff. Da disse betingelsene var fastsatt, ble det analysert prøver med konsentrasjonene 624,21 ng ml⁻¹, 1248,41 ng ml⁻¹, 2496,83 ng ml⁻¹, 4993,65 ng ml⁻¹ og 9987,3 ng ml⁻¹ for å finne hvilken konsentrasjon av N-7084 som ville være optimal å

tilsette av internstandarden i hver prøve. Stamløsningen for N-7084 ble fortynnet med vann:acetonitril:maursyre 50:50:0,1 (v/v/v) for å gi de ønskede konsentrasjonene, og det ble injisert 5 µl av hver prøve i HPLC-MS/MS.

Da de kromatografiske betingelsene for internstandarden var fastsatt, ble det oppdaget et mulig separasjonsproblem mellom tiklopidin og internstandarden. Dette ble løst ved å teste ut flere mobilfasesammensetninger enn det som var testet ut tidligere.

Tabell 4: Sammensetning av mobilfase A og B for optimalisering av separasjon av tiklopidin og N-7084

Prosentandel av mobilfase A (Milli-Q vann, 0,1% maursyre)	Prosentandel av mobilfase B (90% acetonitril, 10% milli-Q vann, 0,1% maursyre)
40	60
45	55
50	50
55	45

Mobilfasesammensetning med 55 % av mobilfase A og 45 % av mobilfase B ble anvendt videre.

Da optimal konsentrasjon av internstandarden var fastsatt, ble denne holdt konstant i alle prøvene, og det ble analysert en serie med ulike konsentrasjoner av analyttene for å finne LOD og LOQ. Konsentrasjonene som ble analysert angis i appendiks 6.3. Videre ble det laget en standardkurve ut fra disse resultatene.

2.5.3 Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin fra SPE av vandige prøver

Eluatene fra SPE med vandige prøver ble analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (se pkt. 2.6.4.1) på HPLC-MS/MS.

2.5.4 Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin i serum tilsatt legemiddel

Eluatene fra SPE av serumprøver tilsatt analyttene ble analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (se pkt. 2.6.4.1) på HPLC-MS/MS.

2.6 UTVIKLING AV MASSESPEKTROMETRISK METODE

2.6.1 MS

For å ta opp MS-spektra i metodeutviklingen for MS ble det benyttet løsninger laget av tablettprøver av klopidogrel og tiklopidin, og bruksløsninger av rent N- 7084. Det ble utført fullscan av løsningene ved hjelp av sprøyteinjeksjoner direkte inn i massespektrometeret, hvor sprøytepumpen hadde en hastighet på 10 µl/ min. Cone voltage (CV) ble justert for å finne optimale verdier for analyttene.

Tabell 5: Molekylmasser for analyttene

Analytt	Mw (gjennomsnitt) (Da)	Mw (monoisotopisk) (u)	[M + H] ⁺ (teoretisk) (u)	[M + H] ⁺ (målt verdi) (m/z)
Klopidogrel	321,82*	321,06	322,07	321,9
Tiklopidin	263,79*	263,05	264,06	264,0
N-7084	303,44	303,19	304,19	304,1

* Hentet fra Merck index

2.6.2 MS/MS

Som for MS, ble det brukt løsninger laget av tablettprøver av klopidogrel og tiklopidin, og bruksløsninger laget av renstoff for N-7084 også i metodeutvikling for produksjonscan og MS/MS. Løsningene ble sprøytet direkte inn i massespektrometeret etter tur ved hjelp av en sprøytepumpe, hvor sprøytepumpen hadde en hastighet på 10 µl/min.

2.6.2.1 Produksjonscan

For produksjonscan ble det brukt løsninger laget av tablettprøver av klopidogrel og tiklopidin, og bruksløsninger laget av renstoff for N-7084. Det ble utført produksjonscan av [M + H]⁺ for analyttene og internstandarden for å finne spesifikke fragmentation for de ulike substansene. MS1 ble låst på [M + H]⁺ for substansene og MS2 skannet. Ved å endre kollisjonsenergien (CE) endres også antall og mengde produksjon. En bestemt CE-verdi vil da kunne gi stor produksjon av et begrenset antall produksjon. Kombinasjonen av en optimal CV og optimal CE vil da danne grunnlag for å sette opp en kvantitativ metode basert på MRM.

2.6.2.2 MS/MS i MRM mode

I MS/MS låses MS1 på foreldreionet. Det brukes kollisjonsgass (argon) på kollisjonscella og MS2 låses på de ønskede fragmentene med høyest m/z -verdi og høyest intensitet som funnet under produksionscan.

2.6.3 HPLC-MS

2.6.3.1 Utvikling av SIR-metode

De nøyaktige m/z verdiene for $[M + H]^+$ til analyttene ble funnet ved sprøyteinjeksjoner av tablettprøver av analyttene. Retensjonstiden til analyttene ble funnet ved fastsettelse av kromatografiske betingelser, og disse verdiene ble benyttet for å fastsette retensjonsvinduer i SIR-metoden. Ved opprettelse av SIR-metoden, ble kun verdiene for $[M + H]^+$ for analyttene benyttet slik at masseanalysatoren kun monitorerte disse spesifikke ionene.

Tabell 6: Verdier benyttet for opprettelse av SIR- metode

Analytt	Masse (m/z)	Dwell time (sec)	CV (V)	Retensjonsvindu (min)
Tiklopidin	264	0,2	25	1-3
Klopidogrel	322	0,2	25	4-6,5

2.6.4 HPLC-MS/MS

For å bli kjent med forbindelsenes egenskaper med hensyn på kromatografi og massespektrometri ble det benyttet tablettløsninger for klopidogrel og tiklopidin. Det ble senere benyttet renstoffer av analyttene og internstandarder for å finne LOD, LOQ og få satt opp en standardkurve.

2.6.4.1 Utvikling av MRM- metode

Som for utvikling av SIR- metoden, ble m/z verdiene til $[M + H]^+$ og fragmentionene for analyttene funnet ved sprøyteinjeksjoner av tablettprøver av analyttene.

m/z verdiene til $[M + H]^+$ ble funnet ved MS fullscan og m/z verdiene til fragmentionene ble funnet ved produksionscan.

Tabell 7: Verdier for MRM analyse av klopidogrel

Parent (<i>m/z</i>)	Daughter (<i>m/z</i>)	Dwell (sec)	Cone (volts)	Coll energy (eV)	Retensjonsvindu (min)
322,0	184,0*	0,5	25	21	8,0-13,0
322,0	212,0	0,5	25	21	8,0-13,0

* Dette ionet ble brukt for kvantifisering

Tabell 8: Verdier for MRM analyse av tiklopidin

Parent (<i>m/z</i>)	Daughter (<i>m/z</i>)	Dwell (sec)	Cone (volts)	Coll energy (eV)	Retensjonsvindu (min)
264,0	154,20*	0,5	25	21	1,0-3,5
264,0	125,10	0,5	25	21	1,0-3,5

* Dette ionet ble brukt for kvantifisering

Tabell 9: Verdier for MRM analyse av N-7084

Parent (<i>m/z</i>)	Daughter (<i>m/z</i>)	Dwell (sec)	Cone (volts)	Coll energy (eV)	Retensjonsvindu (min)
304,1	191,2*	0,5	35	35	2,5-7,5
304,1	218,3	0,5	35	35	2,5-7,5

* Dette ionet ble brukt for kvantifisering

2.7 ANALYSE AV BLODPRØVER FRA PASIENTER

Det ble utarbeidet og sendt en søknad til Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk, Nord- Norge (REK-Nord) om tillatelse til å analysere plasmaprøver fra pasienter som gjennomgått PCI ved Universitetssykehuset i Nord- Norge. Grunnet manglende tilbakemelding fra REK-Nord og mangel på tid ble det ikke utført analyse av reelle blodprøver fra pasienter.

3 RESULTAT OG DISKUSJON

3.1 INTERNSTANDARD

N-7084 ble valgt som internstandard siden den eluerer ut mellom analyttene, er tilgjengelig i ren form og gir grei kromatografi på en standard C₁₈ HPLC-kolonne. I denne oppgaven holdtes arealene for toppene til N-7084 temmelig stabile og N-7084 er egnet som internstandard i denne metoden.

I litteraturen har tiklopidin blitt benyttet som intern standard ved analyse av klopidogrels inaktive syremetabolitt [22, 23]. Tiklopidin vil imidlertid ikke egne seg som internstandard i metoden som er utviklet i denne oppgaven fordi denne substansen ikke elueres fullstendig ut under SPE-prosedyren. I et tilfelle der tiklopidin ble benyttet som internstandard ble det benyttet LLE med dietyl eter/n-heksan (8:2, v/v) for prøveopparbeidelse [23].

I en annen artikkel har repaglinid blitt benyttet som internstandard ved analyse av klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitt. Repaglinid kunne benyttes som internstandard grunnet at denne forbindelsen og klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitt har noen like fysikalskjemiske egenskaper [24]. Det er også litteratur tilgjengelig der fenytoin har blitt benyttet som internstandard ved analyse av den inaktive karboksylsyremetabolitten [25]. Dersom det mot formodning skulle oppstå et problem i forhold til bruk av N-7084 vil en av disse forbindelsene kunne testes som internstandard i denne metoden.

Det kan det være ugunstig å bruke andre legemidler som internstandard da disse kan være til stede i en biologisk prøve dersom pasienten også bruker dette legemidlet. Dette vil høyst sannsynlig ikke være tilfellet for tiklopidin da det neppe vil være aktuelt å behandle pasienter med begge legemidlene samtidig.

3.2 TILLAGING AV LØSNINGER

Som beskrevet i pkt. 2.2.1 ble det laget tablettløsninger for klopidogrel og tiklopidin. Nøyaktige konsentrasjoner for tablettprøvene var ikke avgjørende da løsningene kun ble benyttet til innledende utvikling av metoder.

Tablettprøver kan benyttes for å bli kjent med forbindelsenes egenskaper med hensyn på kromatografi og massespektrometri. Tillaging av tablettprøver kan imidlertid være en

tidkrevende prosess da tablettene må knuses i morter og eventuelt sentrifugeres. I dette tilfellet måtte løsningsene sentrifugeres fordi hjelpestoffene i tablettene tettet igjen porene i filteret ved filtrering av tablettløsningene. I dette tilfellet var det tiklopidin som var særlig tidkrevende ved at løsningsene måtte sentrifugeres i 90 minutter. Et problem som kan oppstå med tillaging av tablettløsninger der sentrifugering er nødvendig, er at noe av virkestoffet går tapt. Dette kan skje ved at noe av virkestoffet legger seg i pelleten sammen med de uløselige hjelpestoffene under sentrifugeringen. Noe av virkestoffet til tiklopidin gikk trolig tapt på denne måten da det viste seg at tablettløsningen hadde en mye lavere konsentrasjon enn først antatt. Dette ble oppdaget når resultatene ble sammenlignet med resultater fra analyse av renstoff. Konsentrasjonen i tablettprøvene vil kun være et estimat og tablettløsninger kan dermed ikke benyttes til kvantitative analyser med lik sikkerhet som løsninger laget av renstoff. Dersom det er renstoff tilgjengelig helt fra starten, vil det være mest tidsbesparende å benytte dette.

Det ble også laget løsninger av renstoff for klopidogrel, tiklopidin og N-7084 (se pkt. 2.2.2). Stammløsningene ble oppbevart i fryseboks ved -20 °C grunnet antagelser om at løsningene holdt seg stabile da det er angitt i litteraturen [24, 26]. Det ble også antatt at bruksløsningene ville holde seg stabile ved oppbevaring i kjøleskap i en uke på grunnlag av at det i litteraturen er antatt at bruksløsninger for klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitt vil holde seg stabil ved oppbevaring i kjøleskap i minst tre uker [25].

3.3 FAST-FASE EKSTRAKSJON AV RENSTOFF I VANDIGE PRØVER

Ulike sammensetninger av vann:metanol ble testet for å se hvilke sammensetninger som vil være tilstrekkelig for å få vasket vekk eventuelle forurensninger og for å eluere ut analyttene. 1 ml vann:metanol 50:50 (v/v) ble ansett som optimal vaskeløsning, og ble dermed benyttet videre for dette formålet. Vann:metanol 20:80 (v/v) viste seg å være mest effektivt for å eluere ut analyttene. Imidlertid viste det seg at denne sammensetningen av vann:metanol ikke var tilstrekkelig for å eluere ut N-7084 og metanol ble derfor benyttet. Ingen av analyttene ble eluert ut ved påsetting av prøve og under vaskeprosessen.

Klopidogrel ble fullstendig eluert ut ved bruk av 5 ml metanol, mens elueringen av N-7084 og tiklopidin ikke var fullstendig selv ved bruk av 7 ml metanol. Metanol som inneholdt 0,05 M HCl ble testet som elueringsmiddel for å se om analyttene eluerte raskere ut. Ved å benytte et surt elueringsmiddel vil funksjonelle grupper på analyttene bli protonert, og forbindelsene vil

dermed retarderes i mindre grad av C₁₈ kjedene som inngår i pakkematerialet i SPE kolonnene. Dette ble bekreftet ved at klopidogrel ble fullstendig eluert ved bruk av 2 ml metanol (0,05 M HCl), mens N-7084 ble eluert fullstendig ut med 4 ml elueringsmiddel. Tiklopidin er imidlertid noe merkelig da den fortsatt ikke elueres fullstendig ut etter bruk av 8 ml metanol (0,05 M HCl). I kromatogrammene ble toppene for klopidogrel brede og taggete i stedet for å ha den fine gausformen de tidligere hadde hatt. Da kromatografien ikke var optimal ble eluatene dampet til tørrhet og reoppløst. Toppene var fortsatt brede selv om formen var noe bedre etter avdamping og reoppløsning av eluatene. Dette diskuteres videre i pkt. 3.5.3.

Det ble undersøkt om fenomenet med brede og taggete topper for klopidogrel ved bruk av metanol inneholdende 0,05 M HCl kunne være avhengig av konsentrasjon HCl i elueringsmidlet. Metanol inneholdende 0,01 M HCl ble derfor testet som elueringsmiddel. Toppene for klopidogrel var fortsatt brede både før og etter avdamping/reoppløsning, og dermed var ikke dette en teori som kunne bekreftes. Dette diskuteres videre i pkt. 3.5.3.

Mye kan endres når serum involveres, og det ble derfor ikke gjort noe mer for å komme frem til en løsning på problemet elueringsmidlet ga for kromatografien. Metoden der metanol (0,01 M HCl) ble benyttet som elueringsmiddel, ble testet videre på serum.

3.4 FAST-FASE EKSTRAKSJON AV RENSTOFF FRA SERUM

Metoden for ekstraksjon av renstoff hvor metanol som inneholdt 0,01 M HCl ble benyttet som elueringsmiddel ble testet på serum tilsatt renstoff av analytt. Det ble først utført SPE av serumprøver for å teste om dette var tilstrekkelig for å fjerne proteinene fra serum. Det var det imidlertid ikke da eluatene var grumsete og gelelignende etter avdamping og reoppløsning. Eluatene ble dermed ikke analysert på HPLC-MS/MS. Med at proteiner og andre bestanddeler i serum ble eluert ut sammen med analyttene under ekstraksjonen, ble utfelling av proteinene i serum før SPE ansett som nødvendig.

Klopidogrel og dens sirkulerende hovedmetabolitt bindes reversibelt til humane plasmaproteiner *in vitro*. [8] Dette vil mest sannsynlig også skje i laboratoriet ved blanding av klopidogrel og serum. Når det er ønskelig å kvantifisere legemiddel i plasmaprøver, vil det ofte være nødvendig å ødelegge bindingene mellom legemiddel og plasma slik at total mengde legemiddel kan ekstraheres før analyse. Utfelling av proteiner er en nyttig prosedyre

ved at proteinene denatureres i denne prosessen og proteinenes kapasitet til å binde legemidler ødelegges. [17] Med tanke på at 98 % av klopidogrel og den sirkulerende hovedmetabolitten er proteinbundet i plasma *in vitro* [8], vil dette være nok et argument for å felle ut proteinene før videre prøveopparbeidelse.

Kald acetonitril i forholdet 1:1 (v/v) med serum og påfølgende sentrifugering ble testet for å felle ut proteinene fra serum. 10 % TCA i Milli-Q vann (w/v) ble også testet for utfelling av proteinene i forholdet 1:1 (v/v) med serum (se pkt. 2.4.2).

Som nevnt vil ikke det som gjelder for vandige prøver nødvendigvis gjelde prøver som inneholder biologiske matrikser. Når problemet med brede topper oppsto ved SPE av vandige prøver, ble det bestemt og ikke dvelte noe mer med dette siden alt kunne endre seg ved serum til stede. Selv om metanol (0,01 M HCl) ikke ga optimale resultater, ble det testet som elueringsmiddel i ulike volum for å se hva som eventuelt ville være tilstrekkelig for å få eluert ut analyttene fra serumprøver. Også her viste det seg at 4 ml metanol (0,01 M HCl) var et tilstrekkelig volum for å få eluert ut klopidogrel og N-7084, mens det fortsatt er uvisst hvorfor tiklopidin ikke eluerer fullstendig ut selv med 8 ml. I og med at tiklopidin nå er mye mindre brukt enn klopidogrel [13], ble det bestemt å hovedsakelig fokusere på klopidogrel selv om tiklopidin fortsatt var til stede i prøvene.

3.4.1 Utfelling av proteiner i serum med kald acetonitril

Den prosedyren for proteinutfelling med kald acetonitril i et 1:1 (v/v) forhold til serum så ut til å være en velfungerende fellingsprosedyre da supernatanten var transparent og hadde en svakt gul farge. Eluatene fra SPE var klare væsker, men etter avdamping var det en hvit hinne på veggene i beholderen som prøven ble dampet av i. Under reoppløsingen fikk prøven en noe fyldigere konsistens enn både det supernatanten og eluatene hadde hatt. I de fleste tilfellene ble de reoppløste eluatene analysert ved hjelp av den utviklede MRM-metoden umiddelbart etter reoppløsning og eventuell utfelling ble dermed ikke oppdaget før etter analysen. Da eluatene ble stående i romtemperatur et lite tidsrom før analyse ble det oppdaget at det skjer en utfelling i vialene ved at det legger seg noe farget grums i bunnen av vialene. Mest sannsynlig var dette proteiner og andre bestanddeler fra serum som ikke ble felt ut under utfellingsprosessen, som ikke ble vasket bort av vaskeløsninga under SPE eller som ikke satt igjen på kolonnen etter eluering av analytt. Hvor raskt disse proteinene feller ut er ikke kjent. Det ble også testet om oppbevaring av de reoppløste eluatene i kjøleskap over natt kunne gi

mer utfelling. Utfellingen var imidlertid lik, uavhengig av om de reoppløste eluatene ble oppbevart i romtemperatur eller i kjøleskap. Ved sentrifugering av vialene etter utfelling ble det dannet en helt blank supernatant som kunne pipetteres ut. Det er mulig at det er denne utfellingen av proteiner etter reoppløsning som fører til at det ikke blir noen linearitet mellom arealene og de laveste konsentrasjonene av klopidoqrel. Dersom det er slik at noe av analytten tapes ved utfellingen kan dette kunne forklare hvorfor det ikke er et lineært forhold mellom areal og konsentrasjon. Ved at det er en mindre mengde analytt i løsningene med laveste konsentrasjoner vil dette utgjøre en stor prosentandel analytt sammenlignet med de høyere konsentrasjonene der det er en større mengde analytt til stede.

Bakgrunnen for å prøve TCA som utfellingsreagens var en artikkel hvor både acetonitril og TCA var sammenlignet som utfellingsreagens for proteiner i serum. I denne artikkelen ble det konkludert med at acetonitril var det mest effektive fellingsreagenset med tanke på recovery av analytt og reproduserbarhet sammenlignet med TCA. I artikkelen ble blankt menneskeplasma tilsatt legemiddel og blandet ved hjelp av vortex-mikser. Acetonitril ble tilsatt, prøven ble blandet ved hjelp av vortex-mikser og sentrifugert i 5 minutter ved 6000 x g. Imidlertid ble acetonitril benyttet i et 2:1 (v/v) forhold til plasma i prøven. [16] Det er også andre artikler som konkluderer med at acetonitril i 2:1 (eller høyere) (v/v) forhold til serum er effektivt for utfelling av proteiner [17]. Det finnes også kilder der det har blitt benyttet acetonitril i 1,5:1 (v/v) forhold til serum [27]. Acetonitril i et 1:1 (v/v) forhold til serum for proteinutfelling som ble brukt i denne oppgaven, kan ha vært for lite til å få felt ut alt av proteiner før SPE, og dette kan forklare utfellingen som skjer over tid. For videre aspekter ville det vært aktuelt å teste en større andel acetonitril for utfelling av proteinene fra serum. Det kunne også vært et alternativ å oppbevare prøvene i fryseren et visst tidsrom etter tilsetning av fellingsreagens og før sentrifugering for å se om dette kan stresse fellingsprosessen. Beregning av recovery for prøven etter sentrifugering og SPE vil også være nødvendig med tanke på videre utvikling av metoden. Ved utvikling av optimal utfellings- og ekstraksjonsprosedyre vil det også være nødvendig og utføre flere ekstraksjonsparalleller for hver konsentrasjon.

3.4.2 Utfelling av proteiner i serum med TCA

Da utfelling av proteiner i serum med acetonitril i 1:1 (v/v) forhold til serum i prøven ikke så ut til å være optimalt, ble 10 % TCA løst i Milli-Q vann (w/v) testet. I litteraturen ble 10 % TCA løsninger laget ved fortynning av konsentrert syre med vann. Blant menneskeplasma ble tilsatt legemiddel og blandet ved hjelp av vortex-mikser. Syreløsningen ble tilsatt i et 1:1 (v/v) forhold til serum i prøven, prøven ble blandet ved hjelp av vortex-mikser og sentrifugert i 5 minutter ved 6000 x g. [16]

I denne oppgaven var ikke 10 % TCA i 1:1 (v/v) forhold til serum et optimalt fellingsreagens for proteinene i serum da det fortsatt skjedde en utfelling i de reoppløste eluatene etter kort tid i romtemperatur. De reoppløste eluatene ble også oppbevart i kjøleskap over natt, og sentrifugert påfølgende dag. Ved analyse av supernatantene var det fortsatt dårlig linearitet mellom mengden analytt og arealet på toppene. Signalet og arealet for de laveste konsentrasjonene var også mye mindre sammenlignet med der acetonitril ble benyttet som fellingsreagens. En mulig forklaring kan være at mer analytt har gått tapt underveis i prøveopparbeidelsen da det var flere sentrifugeringstrinn involvert ved bruk av TCA enn ved bruk av acetonitril.

Dersom ikke utfelling av proteiner blir optimal ved å øke volumet acetonitril kan det være et alternativ å prøve TCA eller andre forbindelser som perklorisyre eller sinksulfat, slik andre har beskrevet. [16, 17] 10 % TCA løst i Milli-Q vann (w/v) har gitt gode resultater for utfelling av proteiner i plasma når det har blitt benyttet i 2:1 (v/v) forhold til serum i prøven. Dersom en ønsker å bruke en syre bør TCA være førstevalget med tanke på effektivitet av proteinfelling. Oppbevaring i fryseboks etter tilsetning av fellingsreagens og før sentrifugering bør også testes ved bruk av TCA. [17]

3.5 UTVIKLING AV VÆSKEKROMATOGRAFI METODE

3.5.1 Utvikling av isokratisk metode fra tablettprøver

Ulike mobilfasesammensetninger ble testet for å finne egnet sammensetning. Ved bruk av 70 % mobilfase B (90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre) ble retensjonstiden for tiklopidin noe kort, samtidig som forskjellen mellom retensjonstiden for tiklopidin og klopidogrel var relativt liten. Dette kan føre til at det blir vanskelig å få separert analyttene tilstrekkelig dersom det skjer forskyvninger i retensjonstiden ved senere analyser. Retensjonstiden for klopidogrel ble noe lengre enn nødvendig ved bruk av 50 % av

mobilfase B (90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre) og 60 % av mobilfase B så med dette ut til å være optimal.

Tabell 10: Retensjonstider for analyttene ved avtagende mengde acetonitril

Legemiddel	70 %	60 %	50 %
Tiklopidin	1,8 min	1,95 min	2,16 min
Klopidogrel	4,1 min	5,11 min	7,16 min

Målet med å utvikle en HPLC-metode er å oppnå god separasjon av analyttene i løpet av kortest mulig analysetid. Dersom man oppnår dette ved en isokratisk mobilfasesammensetning, vil dette oftest være ideelt. Ved isokratisk eluering vil neste analyse kunne starte umiddelbart etter den foregående, mens ved bruk av gradienteluering må det legges inn et bestemt tidsrom mellom hver analyse slik at kolonnen og systemet får tilbakestill seg til start. Grunnet dette vil det oftest kunne utføres flere analyser per tidsenhet ved bruk av isokratisk eluering enn ved bruk av gradient eluering. Isokratisk eluering krever også et enklere utstyr enn gradient eluering. Isokratisk eluering ble ansett som mest ideell i denne oppgaven ved at analyttene ble godt separert, retensjonstiden var akseptabel siden analyttene ble eluert ut i løpet av 5,5 minutter og med tanke på at neste analyse kan starte umiddelbart etter den foregående.

For å kunne fange opp eventuell non-respons hos pasienter, må metabolitter av klopidogrel også være med i analysene. Ved HPLC-MS/MS analyse av klopidogrel og dens inaktive syremetabolitt og de vil høyst sannsynlig separeres ved at metabolitten elueres ut av kolonnen før modersubstansen klopidogrel. Dersom det er mulig å analysere klopidogrels aktive thiolmetabolitt, vil denne elueres ut først, mens den inaktive karboksylsyremetabolitten elueres ut et sted mellom den aktive thiolmetabolitten og klopidogrel. Om det kommer til å oppstå et separasjonsproblem mellom metabolittene og N-7084 er vanskelig å forutse. Dersom et slikt problem oppstår vil gradienteluering være et mulig alternativ.

3.5.2 Kromatografi av renstoff og internstandard i vandige prøver

Optimal konsentrasjon av internstandard skal gi et areal som ligger midt på eller i nedre sjikt av analyttens standardkurve. For å finne optimal konsentrasjon som skulle benyttes av N-7084 i hver prøve, ble ulike konsentrasjoner analysert. Analysedata er angitt i tabell 11.

Tabell 11: MRM analyse av N-7084

Konsentrasjon N-7084 (ng ml ⁻¹)	Mengde injisert (ng/5µl)	Fragment	t _R	Areal
624,21	3,13	304,1 > 218,3	2,34	1539
			2,34	1824
		304,1 > 191,2	2,34	7945
			2,34	9183
1248,41	6,25	304,1 > 218,3	2,34	3599
			2,34	3758
		304,1 > 191,2	2,34	17694
			2,34	18009
2496,83	12,50	304,1 > 218,3	2,34	7294
			2,34	7202
		304,1 > 191,2	2,34	32325
			2,34	32182
4993,65	25,00	304,1 > 218,3	2,34	12830
			2,34	14001
		304,1 > 191,2	2,34	57415
			2,34	58025
9987,3	50,00	304,1 > 218,3	2,34	25223
			2,34	24444
		304,1 > 191,2	2,34	102878
			2,34	99309

Optimal konsentrasjon av internstandarden i vandige prøver ble satt til å være 299,6 ng ml⁻¹.

Ved bruk av N-7084 som internstandard holder arealet for toppene til N-7084 seg temmelig stabilt og N-7084 vil kunne benyttes som internstandard. Om N-7084 vil egne seg som internstandard ved analyse av klopidogrels metabolitter er vanskelig å forutsi, men mest sannsynlig vil det gå fint.

Retensjonstiden for internstandarden N-7084 ved en mobilfasesammensetning som bestod av 40 % A (Milli-Q vann tilsatt 0,1 % maursyre) og 60 % B (90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre) var 2,40 minutter, mens retensjonstiden for tiklopidin var 1,91 minutter. Dette kunne gi et mulig separasjonsproblem mellom internstandarden og tiklopidin. Ved å senke elueringsstyrken på mobilfasen, vil k' for alle substansene øke og en vil oppnå bedre separasjon. (se ligning 5 pkt. 1.6.1.6).

Det ble gjort flere analyser med en prøve som inneholdt internstandarden og begge analyttene for å finne nye retensjonstider med ulike mobilfasesammensetninger.

Tabell 12: Retensjonstider for analyttene og internstandarden ved ulike sammensetninger av mobilfase A og mobilfase B

	Mobilfase A	Mobilfase B	Retensjonstid tiklopidin	Retensjonstid N-7084	Retensjonstid klopidogrel
1	40	60	1,91	2,40	5,57
2	45	55	2,02	2,80	6,67
3	50	50	2,13	3,46	8,10
4	55	45	2,31	4,73	10,24

Ut fra dette ble 55 % mobilfase A (Milli-Q vann tilsatt 0,1 % maursyre) og 45 % mobilfase B (90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre) ansett som den mobilfasesammensetningen som ga best separasjon av tiklopidin og internstandarden. Med denne mobilfasesammensetningen vil en kunne anslå at analyttene separeres tilstrekkelig og dermed ble denne sammensetningen ansett som best egnet og benyttet videre. Dersom retensjonstiden for klopidogrel hadde blitt mye lengre enn 10 minutter ville det vært et alternativ å gå over til gradienteluering i stedet.

Da det mulige separasjonsproblemet var løst og ønsket konsentrasjon av internstandard var fastsatt til å være $299,6 \text{ ng ml}^{-1}$, ble det analysert en serie med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.3 for å få laget en standardkurve, og for å finne LOD og LOQ.

3.5.2.1 Limit of detection (LOD)

LOD er den laveste konsentrasjonen av analytt som med sikkerhet kan detekteres av analyseinstrumentet. Dersom konsentrasjonen av analytt i prøven er større eller lik deteksjonsgrensen, kan analytten detekteres. LOD beregnes ut fra signal to noise ratio (S/N), og LOD har en $S/N=3$ som deteksjonsgrense. Dette betyr at 1/3 av analyttsignalet kan være støy. Deteksjonsgrensen vil påvirkes av prøvesammensetningen, utbytte etter prøveopparbeidelsen og kromatografiske parametre. [15]

LOD ble bestemt ved å analysere flere prøver i en fortyningsserie. LOD for klopidogrel ble beregnet til å være 9 ng ml^{-1} , og LOD for tiklopidin ble beregnet til 6 ng ml^{-1} . Ved injeksjon av $5 \mu\text{l}$ vil LOD på kolonnen være 45 pg for klopidogrel og 30 pg for tiklopidin.

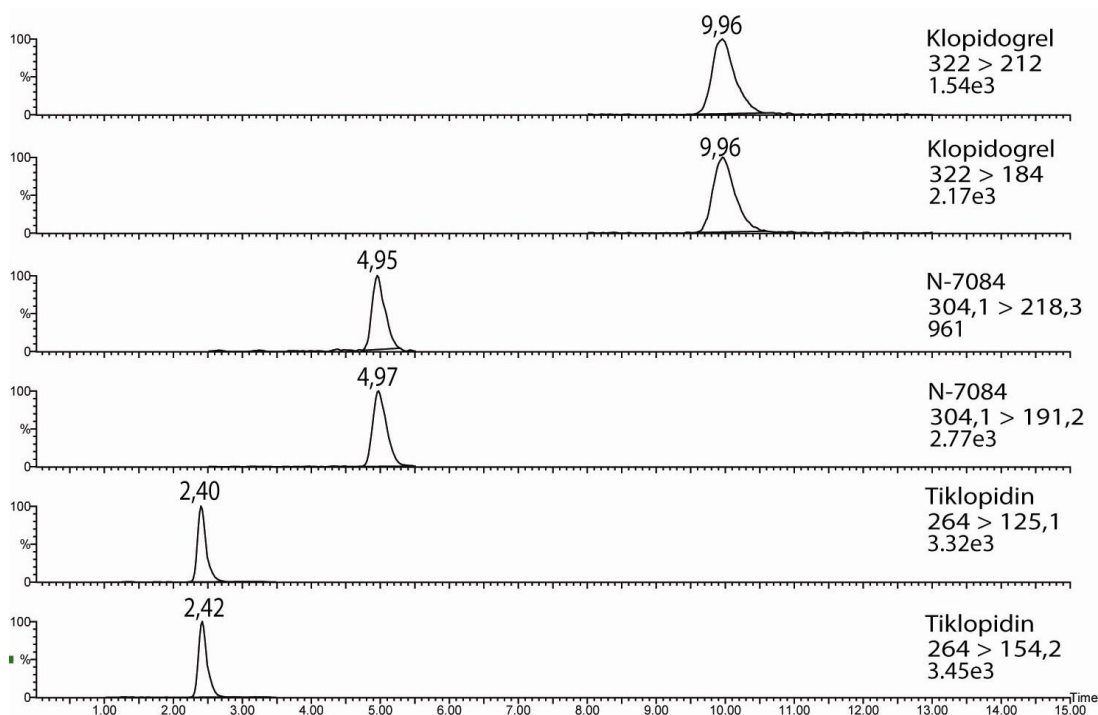
3.5.2.2 Limit of quantification (LOQ)

LOQ er den laveste konsentrasjonen av analytten som kan bestemmes med nøyaktighet og reproduserbarhet. LOQ beregnes også ut fra signal to noise ratio (S/N), og LOQ har en $S/N = 10$ som kvantifiseringsgrense. [15]

LOQ ble bestemt ved å analysere flere prøver i en fortyningsserie. LOQ for klopidogrel ble beregnet til å være 31 ng ml^{-1} , og LOD for tiklopidin ble beregnet til 17 ng ml^{-1} . Ved injeksjon av $5 \text{ } \mu\text{l}$ vil LOQ på kolonnen være 155 pg for klopidogrel og 85 pg for tiklopidin.

3.5.2.3 Standardkurve

Standardkurvene for vandige prøver av klopidogrel og tiklopidin ble laget med tanke på å kunne kvantifisere ukjente prøver ved hjelp av den utviklede MRM-metoden (som beskrevet i pkt.2.6.4.1). Standardkurven ble laget ved å analysere 12 ulike konsentrasjoner av analyttene (se appendiks 6.3), hvor det ble utført 2 paralleller av hver. Prøvene ble injisert i en stigende konsentrasjonsrekkefølge fra lavest til høyest. Det ble injisert $5 \text{ } \mu\text{l}$ av hver prøve i HPLC. Ved tillaging av kurven ble alle målingene brukt. Formel og korrelasjonskoeffisient er angitt på kurven.

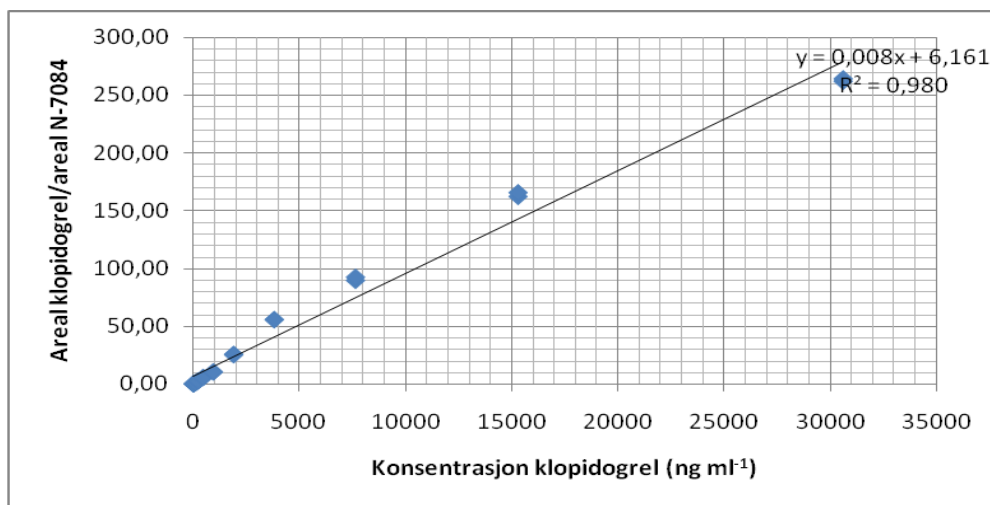


Figur 14: Kromatogram fra analyse av vandige prøver av klopidogrel, N-7084 og tiklopidin

3. Resultat og diskusjon

Tabell 13: Standardkurve for klopidogrel i vandige prøver

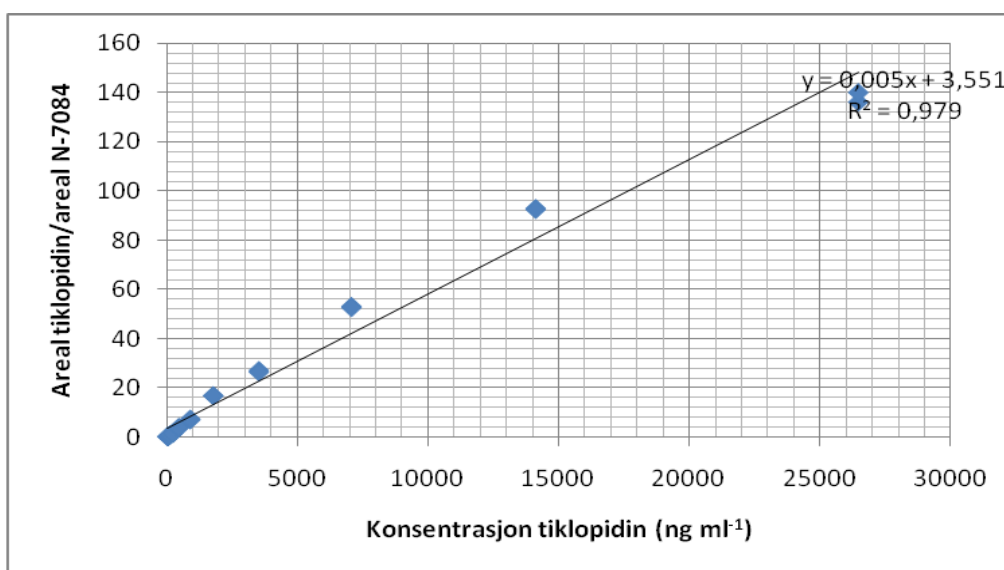
Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/ areal N-7084
14,96	102	706	0,14
14,96	89	647	0,14
29,92	195	664	0,29
29,92	219	684	0,32
59,84	445	695	0,59
59,84	437	747	0,59
119,69	795	652	1,22
119,69	795	638	1,25
239,38	1877	706	2,66
239,38	1978	749	2,64
478,75	4237	727	5,83
478,75	4498	797	5,64
957,50	8790	823	10,68
957,50	8743	837	10,45
1915	19780	767	25,79
1915	19807	784	25,26
3830	48501	868	55,88
3830	48288	870	55,50
7660	82806	925	89,52
7660	85984	931	92,36
15320	164313	1014	162,04
15320	169647	1025	165,51
30640	305645	1168	261,68
30640	309226	1172	263,84



Figur 15: Standardkurve for vandige prøver av klopidogrel

Tabell 14: Standardkurve for tiklopidin i vandige prøver

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Tiklopidin (264>154,2)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal tiklopidin/ areal N-7084
13,24	83	706	0,12
13,24	62	647	0,10
26,48	138	664	0,21
26,48	146	684	0,21
52,95	305	695	0,37
52,95	278	747	0,37
109,76	506	652	0,78
109,76	506	638	0,79
219,53	1124	706	1,59
219,53	1090	749	1,46
441,69	2781	727	3,83
441,69	3027	797	3,80
882,5	5695	823	6,92
882,5	6107	837	7,30
1765	12857	767	16,76
1765	13141	784	16,76
3512,44	23497	868	27,07
3512,44	22940	870	26,37
7060	49152	925	53,14
7060	49010	931	52,64
14120	94293	1014	92,99
14120	94893	1025	92,58
26481,62	159169	1168	136,27
26481,62	164246	1172	140,14



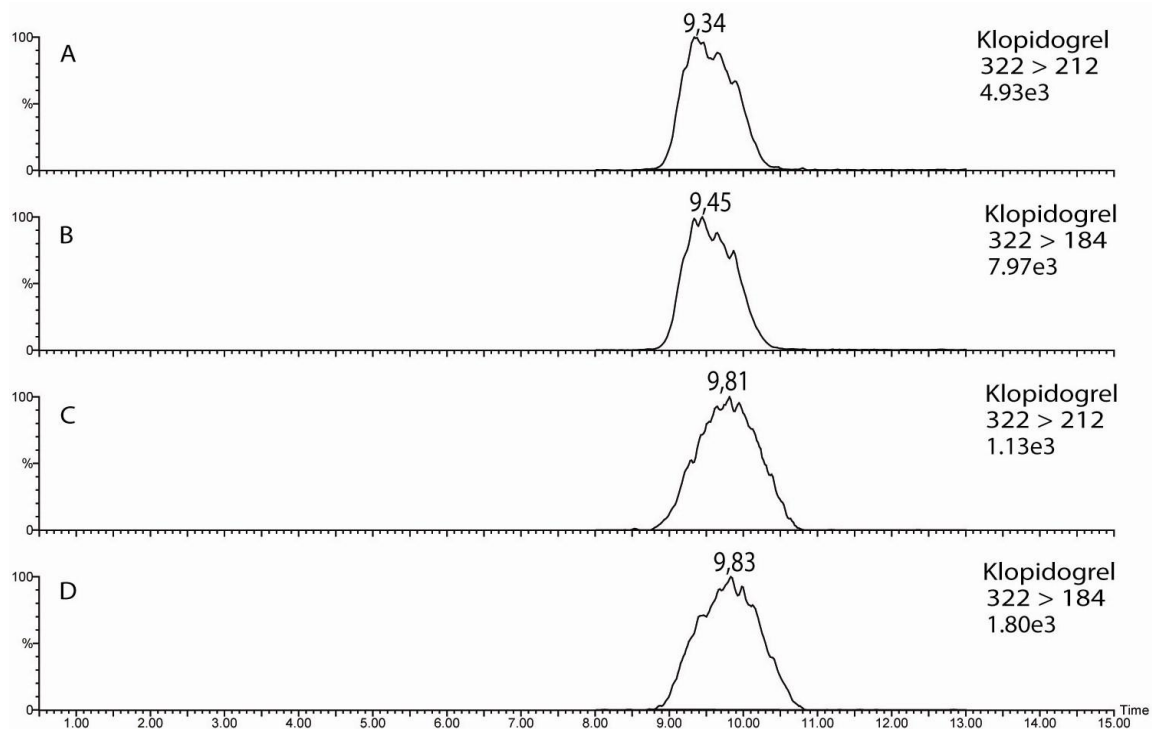
Figur 16: Standardkurve for vandige prøver av tiklopidin

For tiklopidinkonsentrasjoner som var antatt å være relativt like i tablettprøver og prøver av renstoff ble arealet under toppene mye større ved bruk av renstoff enn ved bruk av tablettprøver. Dette viser at konsentrasjonen var lavere enn beregnet ved tablettprøvene, og dette skyldes trolig at noe av virkestoffet gikk tapt ved knusing, sentrifugering etc. Tabletter er derfor ikke egnet som stoffkilde for tillaging av standardløsninger.

Ved beregning av LOD og LOQ ble det benyttet 4 paralleller i utregningen for klopidogrel og 2 paralleller for tiklopidin. Dette vil være for få paralleller til å kunne trekke noen endelig konklusjon. Det burde derfor være flere paralleller tilgjengelig. Det samme gjelder også for tillaging av standardkurvene der det kun var analysert to paralleller av hver konsentrasjon, mens det minst burde ha vært analysert 6 paralleller av hver konsentrasjon.

3.5.3 Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin fra SPE av vandige prøver

Toppene for klopidogrel ble brede og taggete ved bruk av metanol som inneholdt 0,05 M HCl som elueringsmiddel (se figur 17). Klopidogrel ble eluert ut ved bruk av 2 x 1 ml elueringsmiddel, og kromatogrammene for disse to analysene er angitt under.



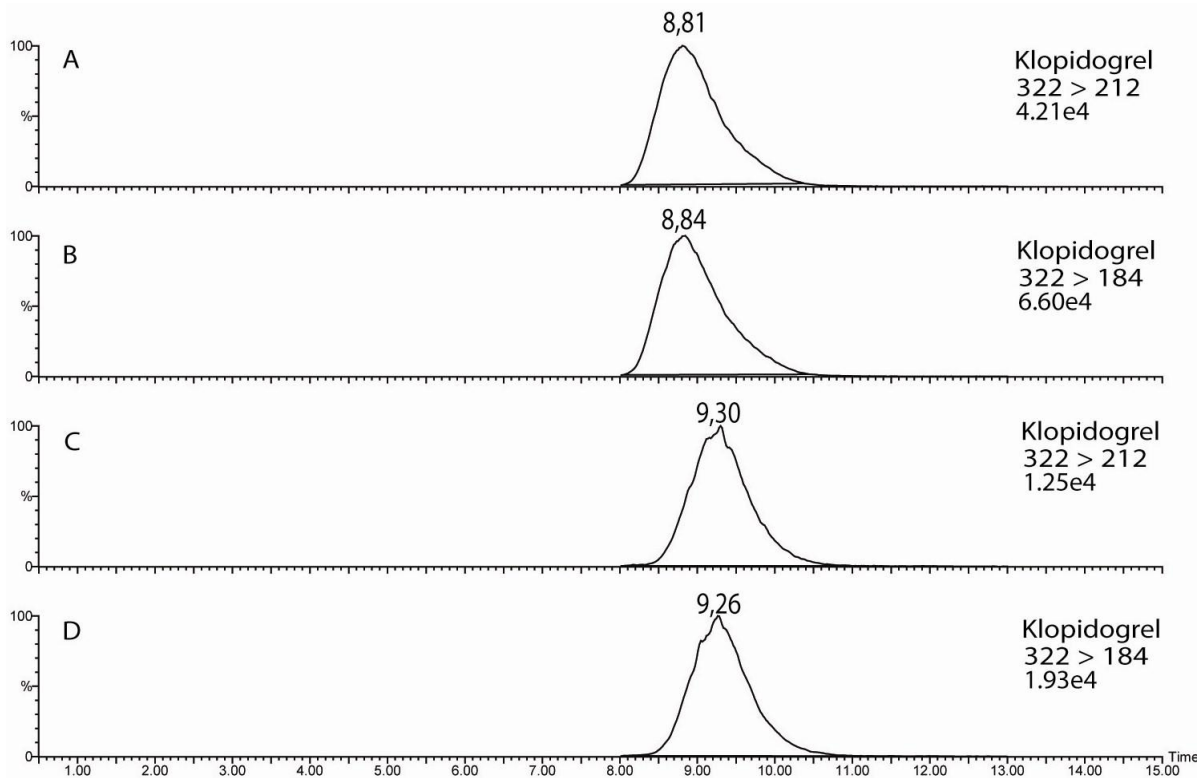
Figur 17: Kromatogram for SPE av klopidogrel med metanol (0,05 M HCl) som elueringsmiddel. A og B er overgangene fra eluering med den første 1 ml fraksjon, og C og D er overgangene fra eluering med den neste 1 ml fraksjon.

3. Resultat og diskusjon

Det kan være vanskelig å angi en bestemt årsak til at toppene fikk denne formen, men det kan ha skjedd en kompleksbinding mellom klopidogrel og bestanddeler i SPE- kolonnen, HCl kan muligens ta med seg noe i SPE- kolonnen som eluerer ut sammen med klopidogrel, eller det kan være båndspredning av analytt allerede ved inngangen av HPLC-kolonnen slik at toppene dras ut og blir brede. En annen mulig forklaring kan være at Cl-ioner som stammer fra HCl er til stede i prøven og forstyrrer MS-analysen når de kommer inn i ESI ionekilden.

Retensjonstiden er også noe lengre for den siste 1 ml fraksjonen av elueringsmiddel (figur 18 C og D) enn for den første 1 ml fraksjonen (figur 17 A og B).

Med at HPLC-MS/MS analyse av eluatene ga brede og taggete toppler, ble eluatene dampet til tørrhet og reoppløst for å se om dette ville gi en finere kromatografi. Kromatogrammene fra analyse av de reoppløste eluatene er angitt nedenfor.



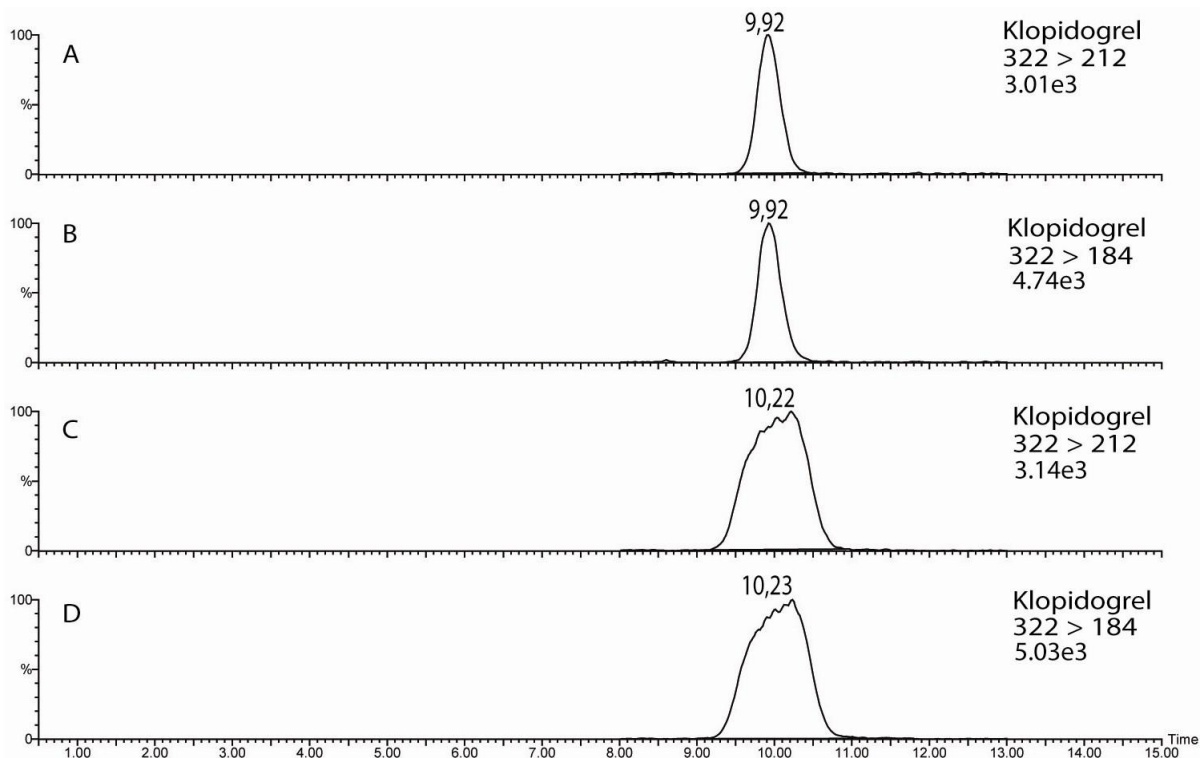
Figur 18: Kromatogram for SPE av klopidogrel med metanol (0,05 M HCl) som elueringsmiddel og påfølgende avdamping/ reoppløsning. A og B er overgangene fra eluering med den første 1 ml fraksjon, og C og D er overgangene fra eluering med den neste 1 ml fraksjon.

Ved avdamping og reoppløsning av eluatene forble toppene brede samtidig som retensjonstiden endret seg for alle overgangene (Figur 18). Imidlertid var det toppene for den første 1 ml fraksjonen av elueringsmiddel som endret formen mest og det ser ut for at det skjer en utstrakt haledannelse (figur 18 A og B). Mulige forklaringene i skrivende stund er at det er rester av

3. Resultat og diskusjon

HCl i prøvene etter avdamping slik at Cl-ioner til stede i prøven forstyrrer MS-analysen når de kommer inn i ESI ione-kilden eller at det er bestanddeler fra SPE- kolonnen som har eluert ut sammen med klopidogrel. Det ble videre undersøkt om dette fenomenet med brede og taggete topper ved bruk av metanol inneholdende 0,05 M HCl kunne være avhengig av konsentrasjon HCl i elueringsmidlet.

Metanol med 0,01 M HCl ble også testet som elueringsmiddel. Kromatogram for analysene er angitt under.



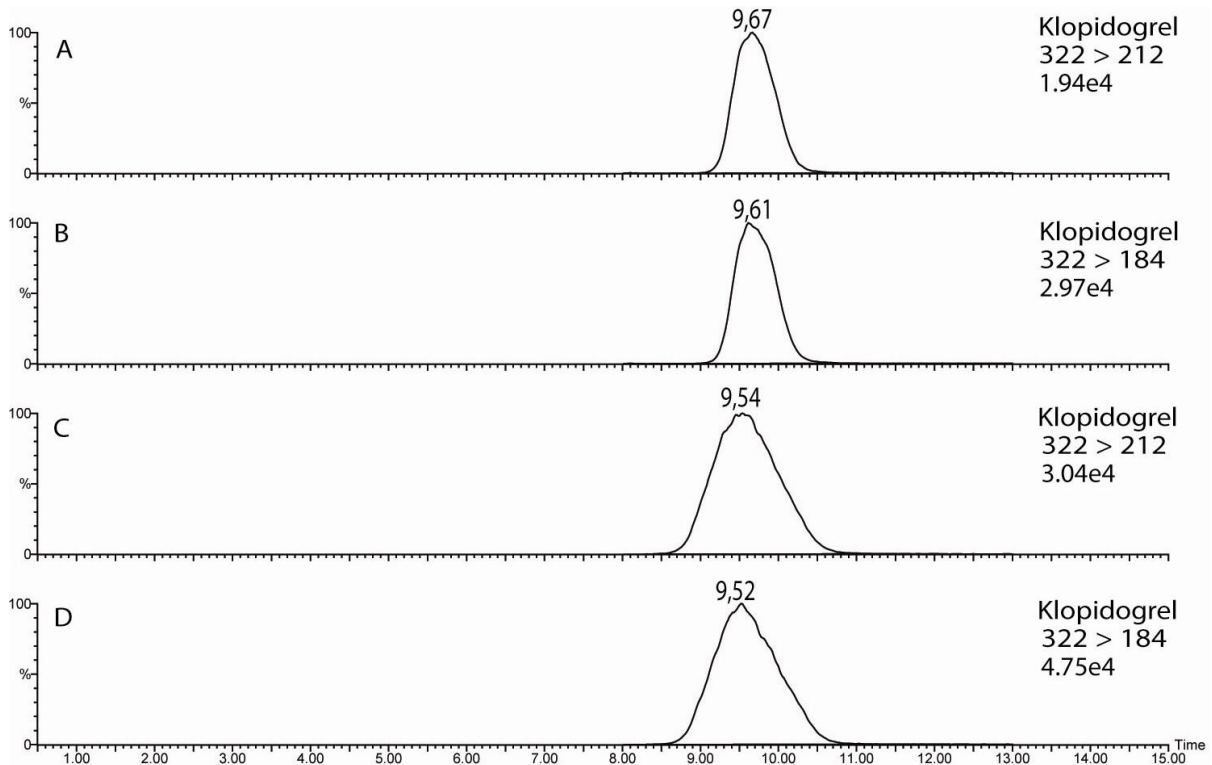
Figur 19: Kromatogram for SPE av klopidogrel med metanol (0,01 M HCl) som elueringsmiddel. A og B er overgangene fra eluering med den første 1 ml fraksjon, og C og D er overgangene fra eluering med den neste 1 ml fraksjon..

Av figur 19 A og B som viser kromatografien av klopidogrel etter eluering med den første 1 ml fraksjonen, kan en se at toppene for overgangene 322>212 og 322>184 er smale og har lik retensjonstid. Toppene har mye smalere form enn der metanol (0,05 M HCl) ble benyttet som elueringsmiddel, og retensjonstiden er nå blitt noe kortere. Imidlertid har toppene for overgangene 322>212 og 322>184 (Figur 19 C og D) for den neste 1 ml fraksjonen elueringsmiddel blitt brede og taggete, samtidig som retensjonstiden er noe lengre enn for den første 1 ml fraksjonen (figur 19 A og B). Dette kan tyde på at det er noe fra SPE- kolonnen

3. Resultat og diskusjon

som eluerer ut sammen med klopidogrel i den siste 1 ml fraksjonen, men som ikke skjer i den første 1 ml fraksjonen.

Ved avdamping og reoppløsning av eluatene fra SPE med metanol (0,01 M HCl) ble toppene for den første 1 ml fraksjonen (figur 20 A og B) noe bredere enn før avdamping selv om formen er relativ lik, og samtidig har retensjonstiden blitt noe kortere. For avdamping/reoppløsning av den neste fraksjonen av 1 ml elueringsmiddel kan en se at toppene blir bredere igjen (figur 20 C og D). En kan med dette se den samme utviklingen både i figur 19 og 20, og dermed er det mest sannsynlig noe til stede i prøven som eluerer ut fra SPE- kolonnen samtidig som klopidogrel i den siste 1 ml fraksjonen av elueringsmiddel.



Figur 20: Kromatogram for SPE av klopidogrel med metanol (0,01 M HCl) som elueringsmiddel og påfølgende avdamping/ reoppløsning. A og B er overgangene fra eluering med den første 1 ml fraksjon, og C og D er overgangene fra eluering med den neste 1 ml fraksjon.

3.5.4 Kromatografi av klopidogrel og tiklopidin i serum tilsatt legemiddel

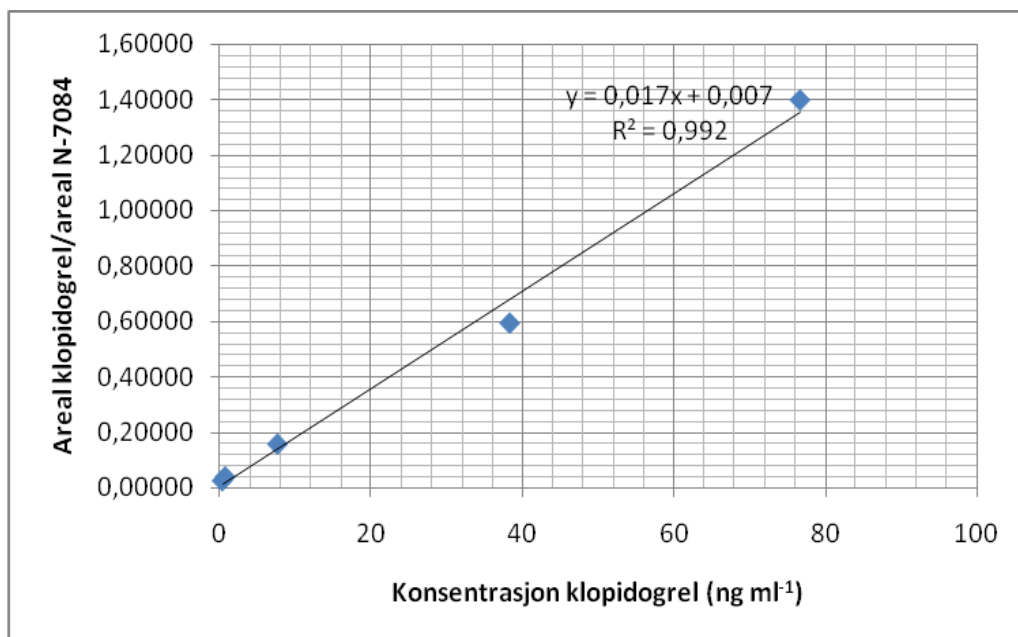
3.5.4.1 Kromatografi av analyttene etter utfelling av proteinene i serum med acetonitril

Tabell 15 og 16 og figur 21 og 22 viser resultater fra analyse av supernatantene fra en serie serumprøver tilsatt analytt, hvor analyttkonsentrasjonene er som angitt i appendiks 6.4 (0,38 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel). Prøvene ble analysert på HPLC-MS/MS direkte etter utfelling av proteiner.

Konsentrasjonene som er angitt i tabellene og grafene er utregnet startkonsentrasjon i prøven.

Tabell 15: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner)

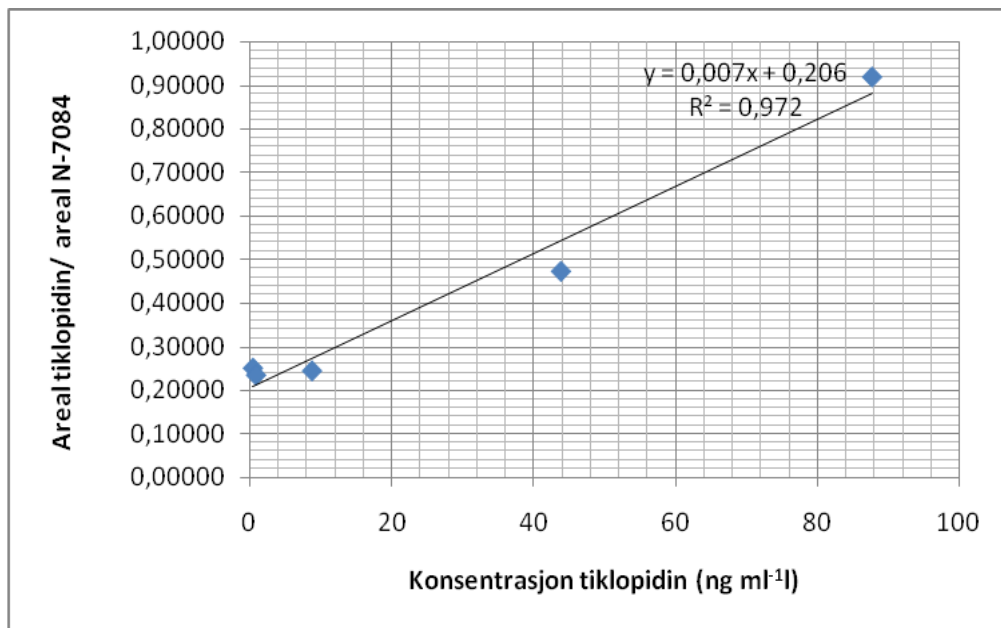
Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/ areal N-7084
0,38	69	2642	0,02612
0,77	110	2780	0,03957
7,66	461	2917	0,15804
38,3	1670	2811	0,59409
76,6	4388	3139	1,39790



Figur 21: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner)

Tabell 16: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Tiklopidin (264>154,2)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal tiklopidin/ areal N-7084
0,44	662	2642	0,25057
0,88	652	2780	0,23453
8,78	713	2917	0,24443
43,91	1330	2811	0,47314
87,81	2887	3139	0,91972



Figur 22: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner)

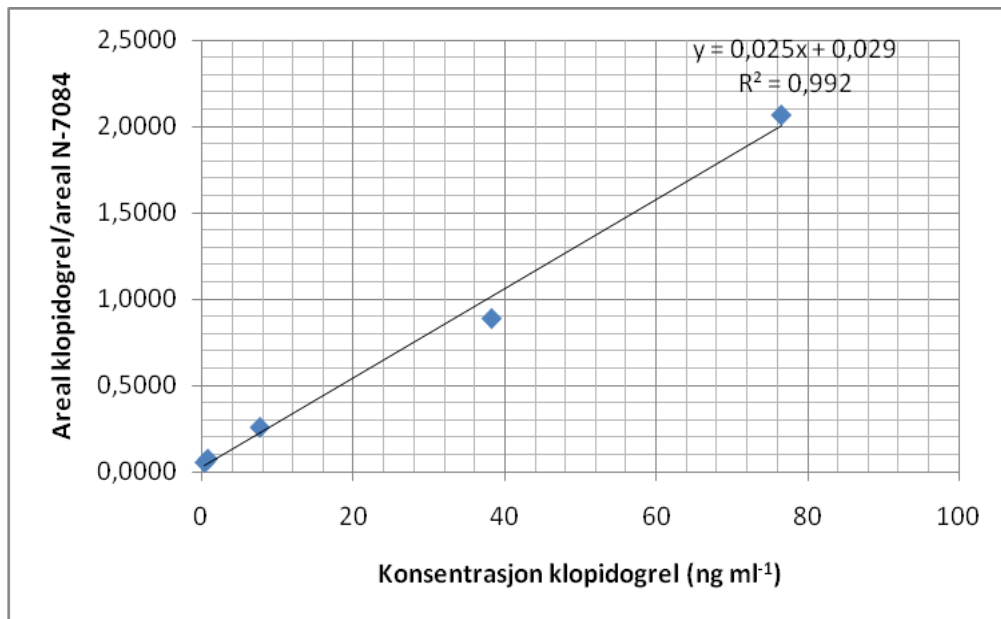
Ved analyse av supernatant på HPLC-MS/MS direkte etter utfelling av proteiner og sentrifugering vil en ikke komme langt nok ned i konsentrasjonsområde. Forventet plasmakonsentrasjon av modersubstansen til klopidogrel i pasientprøver 2 timer etter administrering, er 0,00025 mg L⁻¹ (0,25 ng ml⁻¹) [8]. Ved analyse av supernatanten fra serumprøven som inneholdt 0,38 ng ml⁻¹ klopidogrel ble det et areal på 69, mens det for supernatanten fra serumprøven som inneholdt 0,77 ng ml⁻¹ klopidogrel ble et areal på 110 (se tabell 15). Disse arealene ligger i samme området som arealet for LOD for vandige prøver. Ved beregning av LOD og LOQ fra vandige prøver var arealet for overgangen 322>184 102 og 89 for den laveste konsentrasjon som ble analysert. Med dette kan en si at et areal på 69 vil være relativt nært deteksjonsgrensen.

3. Resultat og diskusjon

Resultatene nedenfor viser analyse av en serie serumprøver med legemiddelkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.4 (0,38 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel). Som angitt i 2.4.1 ble prøvene sentrifugert, dampet til tørrhet og reoppløst i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann.

Tabell 17: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/areal N-7084
0,38	829	15448	0,0537
0,77	1288	17609	0,0731
7,66	4489	17456	0,2572
38,3	13490	15171	0,8892
76,6	49396	23864	2,0699



Figur 23: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann)

Ved avdamping og reoppløsning av supernatantene etter utfelling av proteiner og sentrifugering, ga en klopidogrelkonsentrasjon på 0,38 ng ml⁻¹ et areal på 829, mens arealet var 69 ved analyse etter sentrifugering av en supernatant med lik klopidogrelkonsentrasjon. Oppkonsentrering vil derfor være nødvendig. Som nevnt er forventet konsentrasjon av modersubstansen klopidogrel 0,25 ng ml⁻¹ 2 timer etter administrering [8]. Dersom blodprøvene tas en del timer senere enn dette vil en høyst sannsynlig ha konsentrasjoner

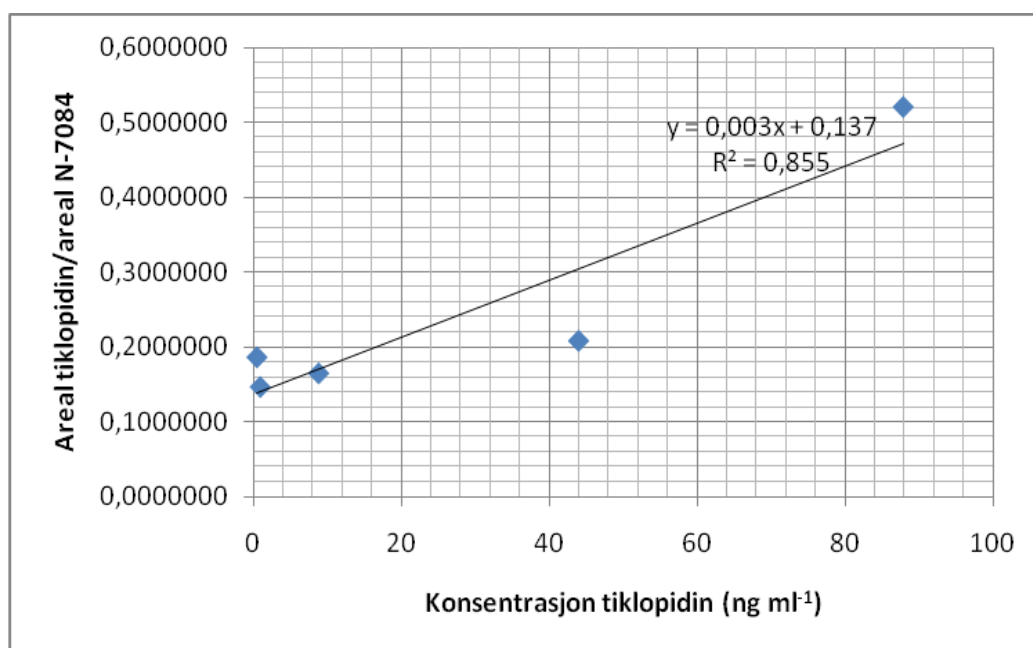
3. Resultat og diskusjon

under deteksjonsgrensen for analyse på HPLC-MS/MS etter utfelling av proteiner, avdamping og reoppløsning.

I kromatogrammene fra analysene ovenfor hadde klopidogrel en stabil retensjonstid og toppene var smale og hadde lik form.

Tabell 18: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Tiklopidin (264>154,2)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal tiklopidin/areal N-7084
0,44	2877	15448	0,1862377
0,88	2583	17609	0,1466864
8,78	2879	17456	0,1649290
43,91	3157	15171	0,2080944
87,81	12404	23864	0,5197787



Figur 24: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 20 µl metanol og 30 µl Milli-Q vann)

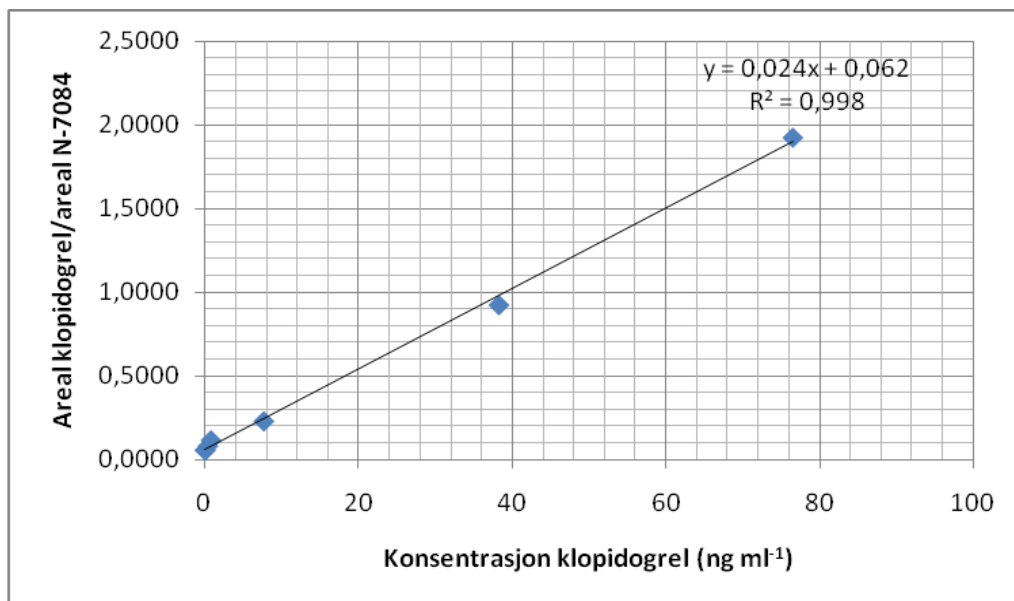
Ved avdamping og reoppløsning av supernatantene etter utfelling av proteiner og sentrifugering, er det ingen klar linearitet mellom tiklopidinkonsentrasjonen og arealet for toppene. Om tiklopidin også vil kunne være bundet til plasmaproteiner som evt. feller ut er uklart.

3. Resultat og diskusjon

Resultatene fra analyse av serumprøver tilsatt analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 (0,0077 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopidogrel) er angitt nedenfor. Som beskrevet i pkt. 2.4.1 ble prøvene sentrifugert, dampet til tørrhet og reoppløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1.

Tabell 19: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/areal N-7084
0,0077	767,8	13246,2	0,0580
0,038	889,9	14909,9	0,0597
0,38	1077,8	12910,4	0,0835
0,77	1444,6	12242,7	0,1180
7,66	3284,6	14187,2	0,2315
38,3	13528,9	14612,4	0,9259
76,6	26304,4	13655,7	1,9263



Figur 25: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

Dersom en ser på data fra hele konsentrasjonsområdet, er lineariteten tilsynelatende bra ($R^2=0,998$) (se tabell 19 og figur 25). Men i konsentrasjonsområdet 0,0077 – 0,77 ng ml⁻¹ er imidlertid linearitet mellom areal og konsentrasjon svært dårlig. Samtidig er det noe til stede i prøven som feller ut over kort tid, hvor dette mest sannsynlig er proteiner og andre bestanddeler i serum som ikke har blitt felt ut under utfellingsprosessen. Den manglende

lineariteten kan dermed skyldes at noe klopidogrel fortsatt er bundet til plasmaproteiner siden det ikke er brukt tilstrekkelig mengde fellingsreagens. På denne måten vil ikke alt virkestoff kunne kvantifiseres med at noe virkestoff fortsatt kan være bundet til plasmaproteinene og dermed være med i bunnfallet som feller ut eller sitter igjen i SPE- kolonnen.

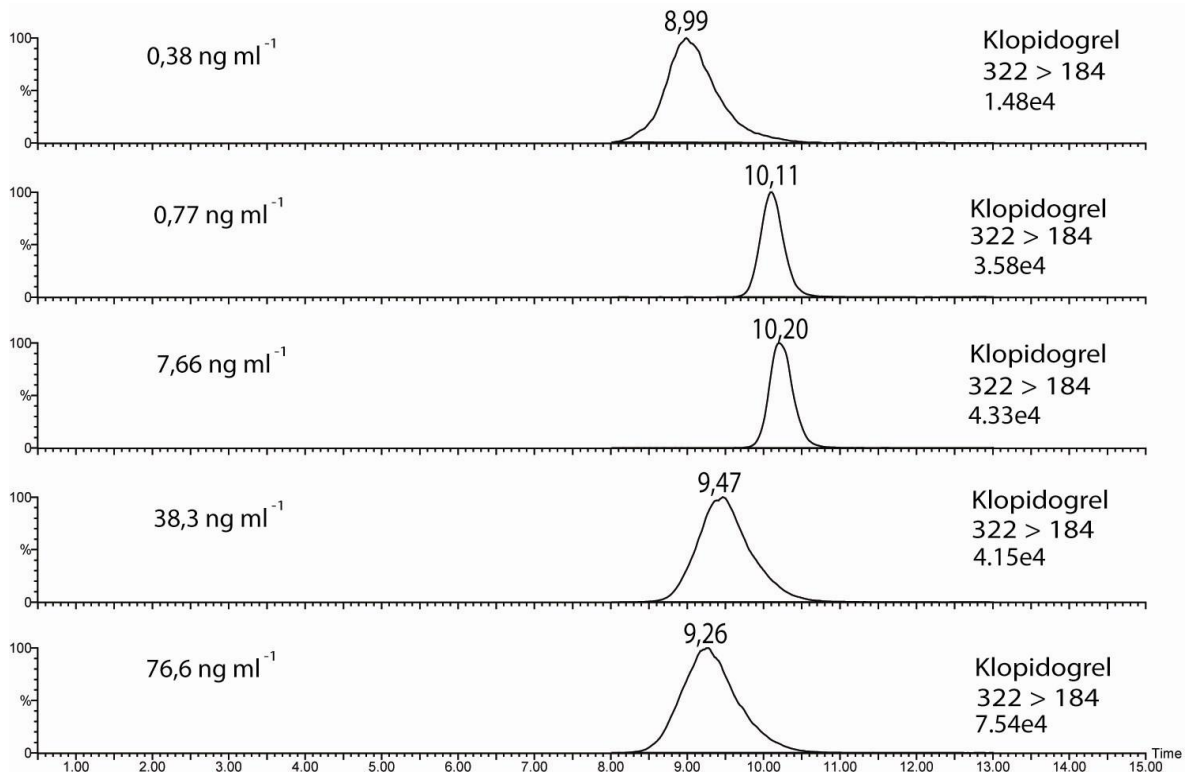
Tabell 20: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner, avdamping til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

Konsentrasjon (ng ml⁻¹)	Areal Tiklopidin (264>154,2)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal tiklopidin/ areal N-7084
0,0088	17,6	13246,3	0,0013302
0,044	19,7	14909,9	0,0013226
0,44	48,2	12910,4	0,0037319
0,88	82,6	12242,7	0,0067428
8,78	924,9	14187,2	0,0651988
43,91	3593,1	14612,4	0,2458946
87,81	7125,5	13655,7	0,5217972

Ved reoppløsning av de avdampede supernatantene i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1, gikk arealene for de ulike tiklopidinkonsentrasjonene drastisk ned, og er lavere enn arealene ved analyse av tiklopidin direkte etter proteinutfelling og sentrifugering. Dette kan tyde på at mindre tiklopidin elueres ut fra fast- fase kolonnen, eller at mindre tiklopidin protoneres og detekteres i MS. Da dette problemet oppsto ble det hovedsakelig fokusert på klopidogrel selv om tiklopidin fortsatt var til stede i serumprøvene.

3. Resultat og diskusjon

Som beskrevet i 2.4.1 ble eluatene fra SPE av en serie spikede serumprøver med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.4 ($0,38 - 76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ for klopidogrel) reoppløst i $20 \mu\text{l}$ metanol og $30 \mu\text{l}$ Milli-Q vann etter avdampning. Kromatogram fra analysene er angitt under.



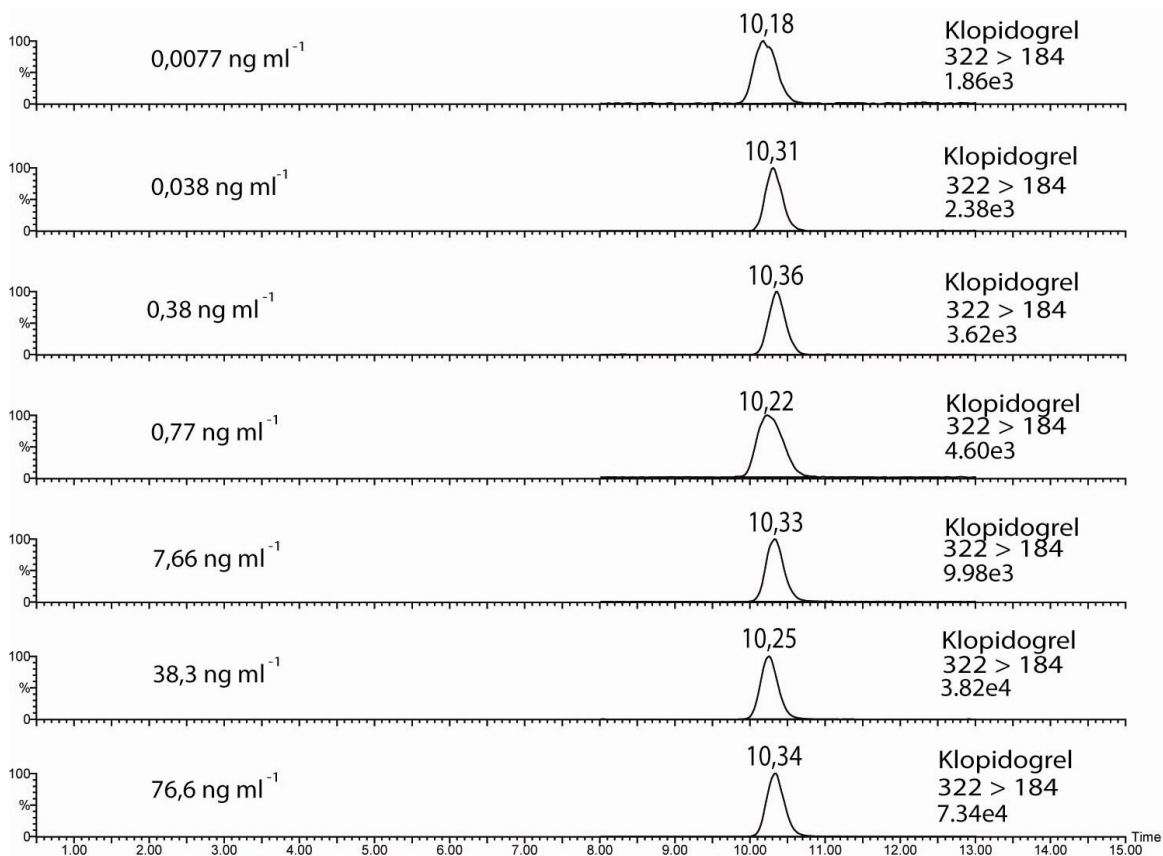
Figur 26: SPE av klopidogrelkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.4 hvor metanol ($0,01 \text{ M HCl}$) ble benyttet som elueringsmiddel og påfølgende avdampning/ reoppløsning i $20 \mu\text{l}$ metanol og $30 \mu\text{l}$ Milli-Q vann etter avdampning

Klopidogrelkonsentrasjonene $0,38 \text{ ng ml}^{-1}$, $38,3 \text{ ng ml}^{-1}$ og $76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ hadde en retensjonstid som var nesten ett minutt kortere enn konsentrasjonene $0,77 \text{ ng ml}^{-1}$ og $7,66 \text{ ng ml}^{-1}$. Samtidig var toppene for konsentrasjonene $0,38 \text{ ng ml}^{-1}$, $38,3 \text{ ng ml}^{-1}$ og $76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ bredere enn toppene for konsentrasjonene $0,77 \text{ ng ml}^{-1}$ og $7,66 \text{ ng ml}^{-1}$. For de prøvene som får brede topper kan det antas at klopidogrel har kompleksbundet til bestanddeler i SPE-kolonnen, at HCl tar med seg noe i SPE-kolonnen som eluerer ut sammen med klopidogrel, eller at HCl er til stede i noen av prøvene etter avdampning slik at Cl-ioner forstyrrer MS-analysen når de kommer inn i ESI ionekilden. Dersom det er HCl til stede i noen av prøvene etter avdampning vil analyttene i disse prøvene være protonert i høyere grad, mens analyttene i de resterende prøvene ikke uttrykkes i like stor grad. Det oppstår altså noen forstyrrelser for klopidogrelkonsentrasjonene $0,38 \text{ ng ml}^{-1}$, $38,3 \text{ ng ml}^{-1}$ og $76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ som gjør toppene brede

3. Resultat og diskusjon

og endrer retensjonstiden, men som ikke er til stede for prøvene som inneholder klopido­gre­l­kon­sen­tra­sjonene $0,77 \text{ ng ml}^{-1}$ og $7,66 \text{ ng ml}^{-1}$. Til sammen­lik­ning hadde den parallellen av de samme konsentrasjonene som ble dampet til tørrhet og reoppløst etter sentrifugering lik form på toppene og relativt lik retensjonstid (beskrevet ved tabell 17 og figur 23).

Som angitt i pkt. 2.4.1 ble det videre analysert en serie spikede serumprøver med analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 ($0,0077 - 76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ for klopido­gre­l) opparbeidet ved SPE etter utfelling av proteiner, dampet til tørrhet og reoppløst i $50 \mu\text{l}$ metanol: Milli-Q vann: maursyre 40:60:0,1. Resultatene er angitt nedenfor.



Figur 27: SPE av klopido­gre­l­kon­sen­tra­sjoner som angitt i appendiks 6.5 hvor metanol (0,01 M HCl) ble benyttet som elueringsmiddel og påfølgende avdampning/ reoppløsning i $50 \mu\text{l}$ metanol: Milli-Q vann: maursyre 40:60:0,1

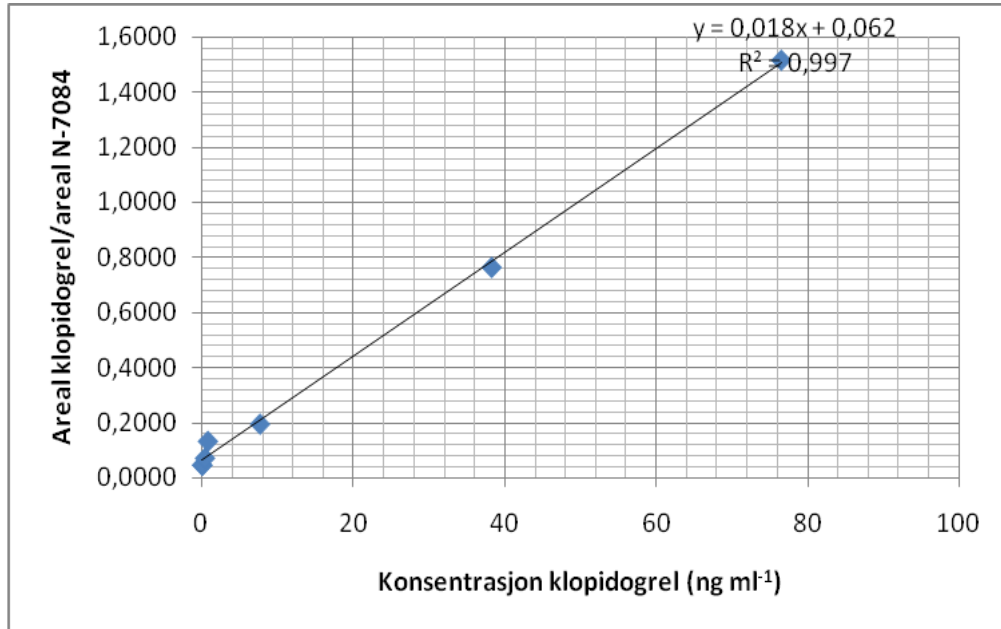
Problemet med brede topper og ulik retensjonstid for enkelte konsentrasjoner ble løst ved å reoppløse de avdampede eluatene i $50 \mu\text{l}$ metanol: Milli-Q vann: maursyre 40:60:0,1. Med dette kan det antas at maursyre kan bryte eventuelle kompleksbindinger som HCl ikke kan

3. Resultat og diskusjon

eller at maursyre til stede i alle prøvene gjør alle prøvene sure og dermed at analyttene i alle prøvene er protonerte og detekteres i lik grad. Samtidig er det usikkert om det kun er maursyre som er årsaken eller om det har skjedd en reaksjon. Det var fortsatt ingen linearitet mellom areal og konsentrasjon i de lavere områdene. Proteiner eller andre bestanddeler i serum feller ut kort tid etter reoppløsning.

Tabell 21: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, SPE med metanol som inneholder 0,01 M HCl for eluering, avdampning til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol: Milli-Q vann: maursyre 40:60:0,1)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/ areal N-7084
0,0077	662,8	14681,8	0,0451
0,038	633,9	13900,7	0,0456
0,38	960,5	13671,5	0,0703
0,77	1863,0	14149,2	0,1317
7,66	2841,9	14622,5	0,1944
38,3	10615,5	13899,3	0,7637
76,6	20524,6	13532,3	1,5167

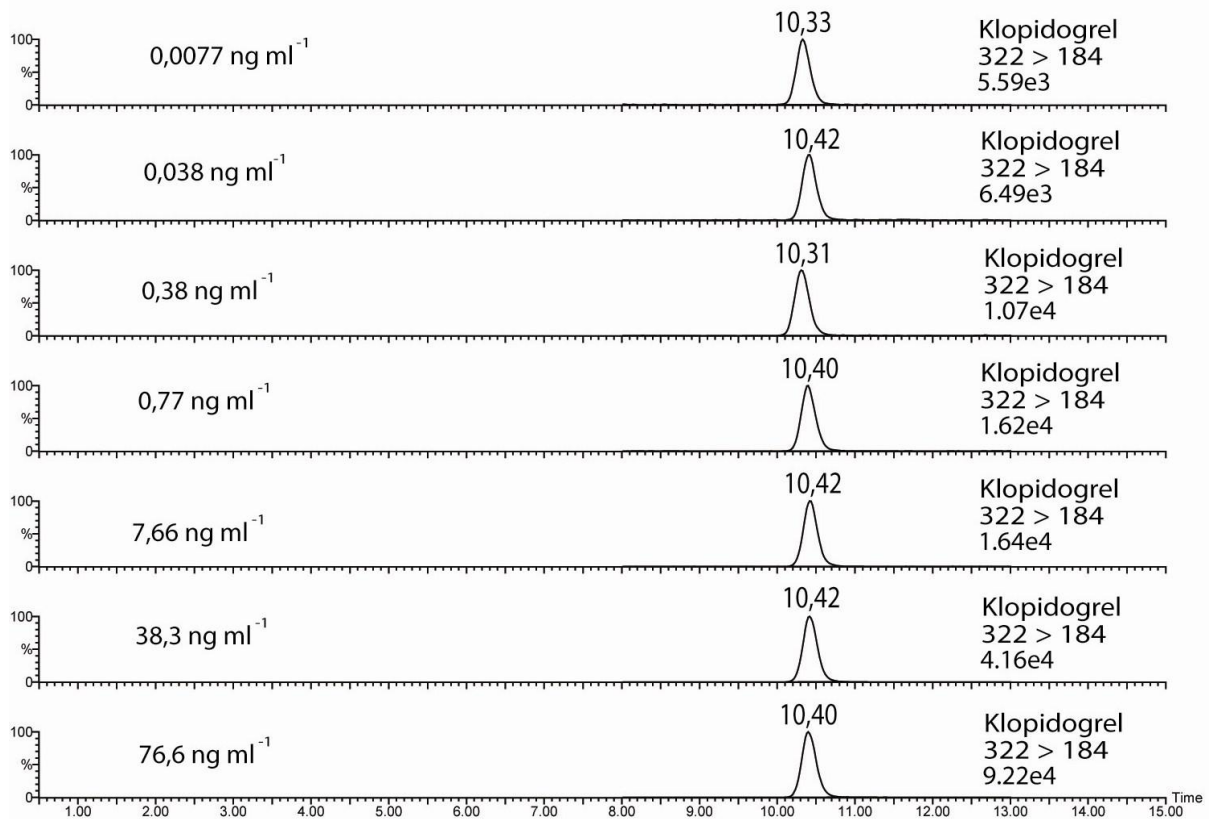


Figur 28: HPLC-MS/MS analyse av serum spiket med klopidogrel (etter utfelling av proteiner, SPE med metanol som inneholder 0,01 M HCl for eluering, avdampning til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol: Milli-Q vann: maursyre 40:60:0,1)

Tiklopidin har imidlertid ikke like stort areal som tidligere for sine topper.

3. Resultat og diskusjon

Som beskrevet i pkt. 2.4.1 ble metanol som inneholdt 0,1 % maursyre også testet som elueringsmiddel. Resultatene nedenfor er fra analyse av serumprøver tilsatt analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 (0,0077 – 76,6 ng ml⁻¹ for klopido­grel). Prøvene ble opparbeidet ved SPE der 0,1 % maursyre ble brukt som elueringsmiddel i stedet for 0,01 M HCl og de avdampede eluatene ble reopløst i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1.



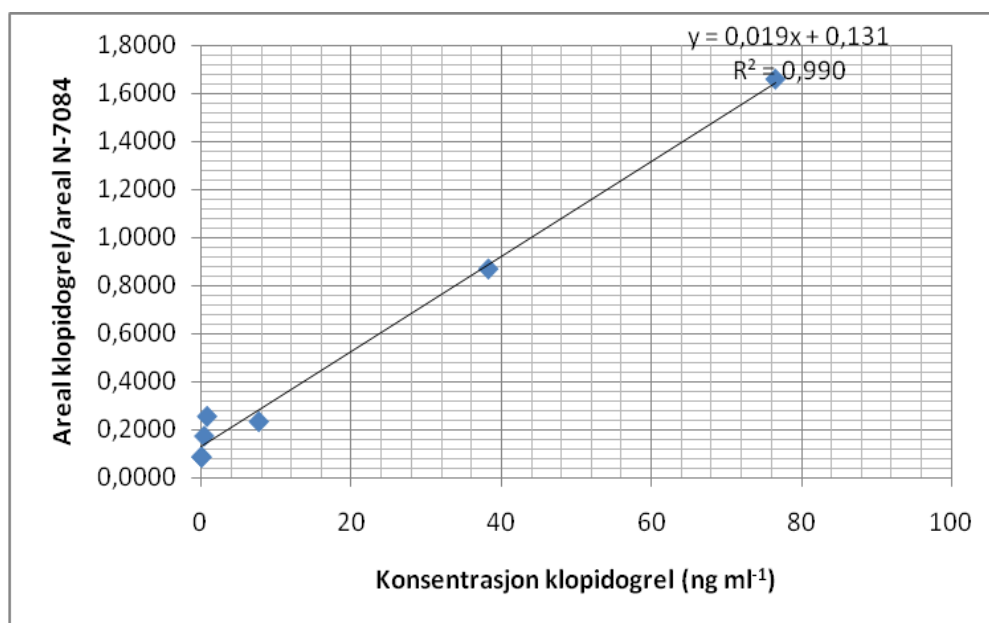
Figur 29: SPE av klopido­grelkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 hvor metanol (0,1 % maursyre) ble benyttet som elueringsmiddel og påfølgende avdamping/ reopløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1

Det kan se ut for at man får et større signal (og høyere areal) for de ulike klopido­grelkonsentrasjonene ved bruk av 0,1 % maursyre som elueringsmiddel. Samtidig kan det se ut som at toppene for de ulike konsentrasjonene er noe smalere enn ved bruk av metanol (0,01 M HCl) (figur 27). Toppene har også veldig lik form for alle konsentrasjonene. Imidlertid er det fortsatt proteiner eller andre bestanddeler i serum som feller ut kort tid etter reopløsning. Det er heller ingen klar linearitet mellom arealene og de ulike analyttkonsentrasjonene i det nedre konsentrasjonsområdet.

3. Resultat og diskusjon

Tabell 22: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, SPE med metanol som inneholder 0,1 % maursyre for eluering, avdamping til tørrhet og reopløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/ areal N-7084
0,0077	1207,2	13718,7	0,0880
0,038	1434,5	16550,3	0,0867
0,38	2432,1	13960,4	0,1742
0,77	3551,5	13864,3	0,2562
7,66	3566,9	15220,7	0,2343
38,3	9302,5	10697,3	0,8696
76,6	20788,1	12530,2	1,6590



Figur 30: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner, SPE med metanol som inneholder 0,1 % maursyre for eluering, avdamping til tørrhet og reopløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

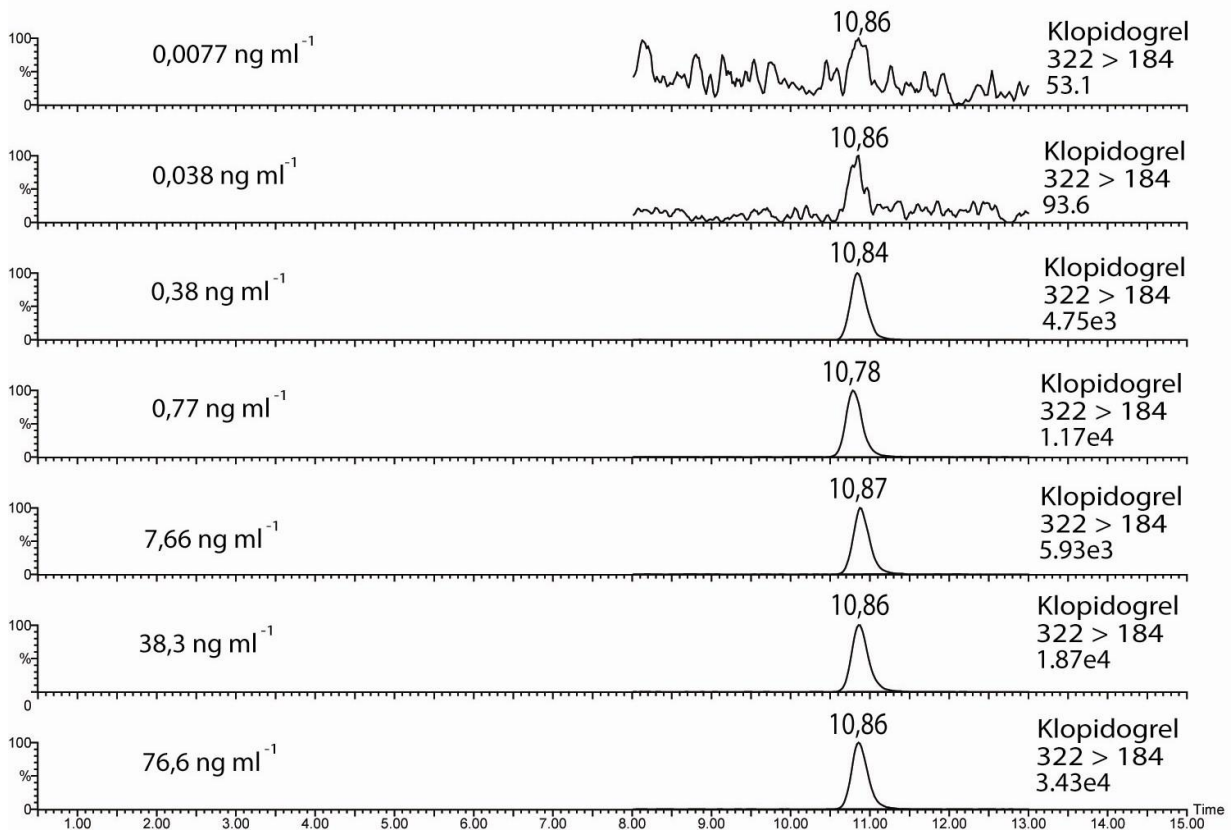
Tabell 23: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt tiklopidin (etter utfelling av proteiner, SPE med metanol som inneholder 0,1 % maursyre for eluering, avdampning til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

Konsentrasjon (ng ml⁻¹)	Areal Tiklopidin (264>154,2)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal tiklopidin/ areal N-7084
0,0088	152,3	13718,7	0,01110
0,044	74,9	16550,3	0,00452
0,44	102,5	13960,4	0,00734
0,88	301,6	13864,3	0,02176
8,78	1163,1	15220,7	0,07642
43,91	4164,7	10697,3	0,38932
87,81	10301,6	12530,2	0,82215

Arealet for toppene til de ulike tiklopidinkonsentrasjonene har gått drastisk ned der 0,1 % maursyre er til stede under reoppløsningen sammenlignet med der det kun ble benyttet metanol og vann. Imidlertid har arealet steget noe ved bruk av metanol (0,1 % maursyre) som elueringsmiddel sammenlignet med metanol (0,01 M HCl) selv om 0,1 % maursyre er til stede under reoppløsningen. Til sammenligning er arealet for tiklopidinkonsentrasjonen 87,81 ng ml⁻¹ ved bruk av metanol (0,1 % maursyre) og reoppløsning der 0,1 % maursyre er til stede 10301,6, mens arealet for tiklopidinkonsentrasjonen 0,44 ng ml⁻¹ var 19567 der metanol (0,01 M) ble benyttet som elueringsmiddel og der prøven ble reoppløst i kun metanol og vann.

3.5.4.2 Kromatografi av analyttene etter utfelling av proteinene i serum med TCA

Som beskrevet i pkt. 2.4.2 ble det til slutt testet om 10 % TCA i Milli-Q vann (w/v) i forholdet 1:1 (v/v) med serum var egnet for utfelling av proteiner. Resultatene nedenfor er fra analyse av analyttkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 ($0,0077 - 76,6 \text{ ng ml}^{-1}$ for klopido­grel) hvor proteinene ble felt ut med TCA, opparbeidet ved SPE der metanol (0,1 % maursyre) ble brukt som elueringsmiddel, og eluatene ble reopløst i 50 μl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1.



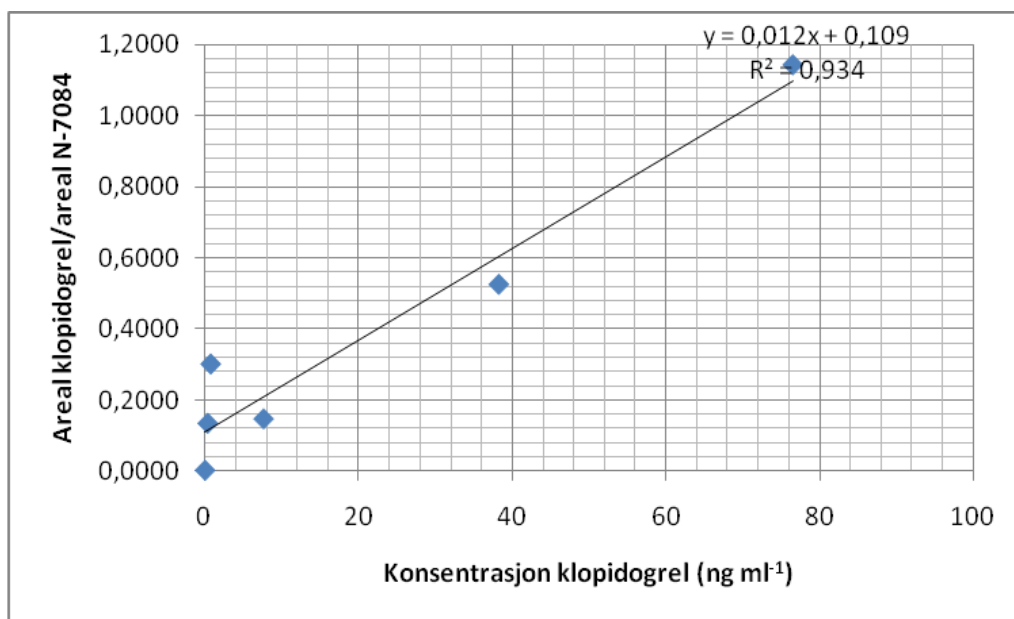
Figur 31: SPE av klopido­grelkonsentrasjoner som angitt i appendiks 6.5 hvor metanol (0,1 % maursyre) ble benyttet som elueringsmiddel og påfølgende avdamping/ reopløsning i 50 μl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1. Utfelling av proteiner i serum ble gjort med TCA,

Ut fra kromatogrammene kan en se at toppene for klopido­grelkonsentrasjonene $0,0077 \text{ ng ml}^{-1}$ og $0,038 \text{ ng ml}^{-1}$ var minimale, samtidig som toppene for de andre konsentrasjonene er generelt mindre enn for de samme konsentrasjonene der acetonitril ble benyttet som fellingsreagens. Lineariteten mellom areal og konsentrasjon av klopido­grel var også verre enn tidligere. En mulig forklaring kan være at mer analytt har gått tapt underveis i prøveoppbeidelsen da det var flere sentrifugeringstrinn involvert ved bruk av TCA enn ved bruk av acetonitril.

3. Resultat og diskusjon

Tabell 24: HPLC-MS/MS analyse av serum tilsatt klopidogrel (etter utfelling av proteiner med TCA, SPE med metanol som inneholder 0,1 % maursyre som elueringsmiddel, avdampning til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

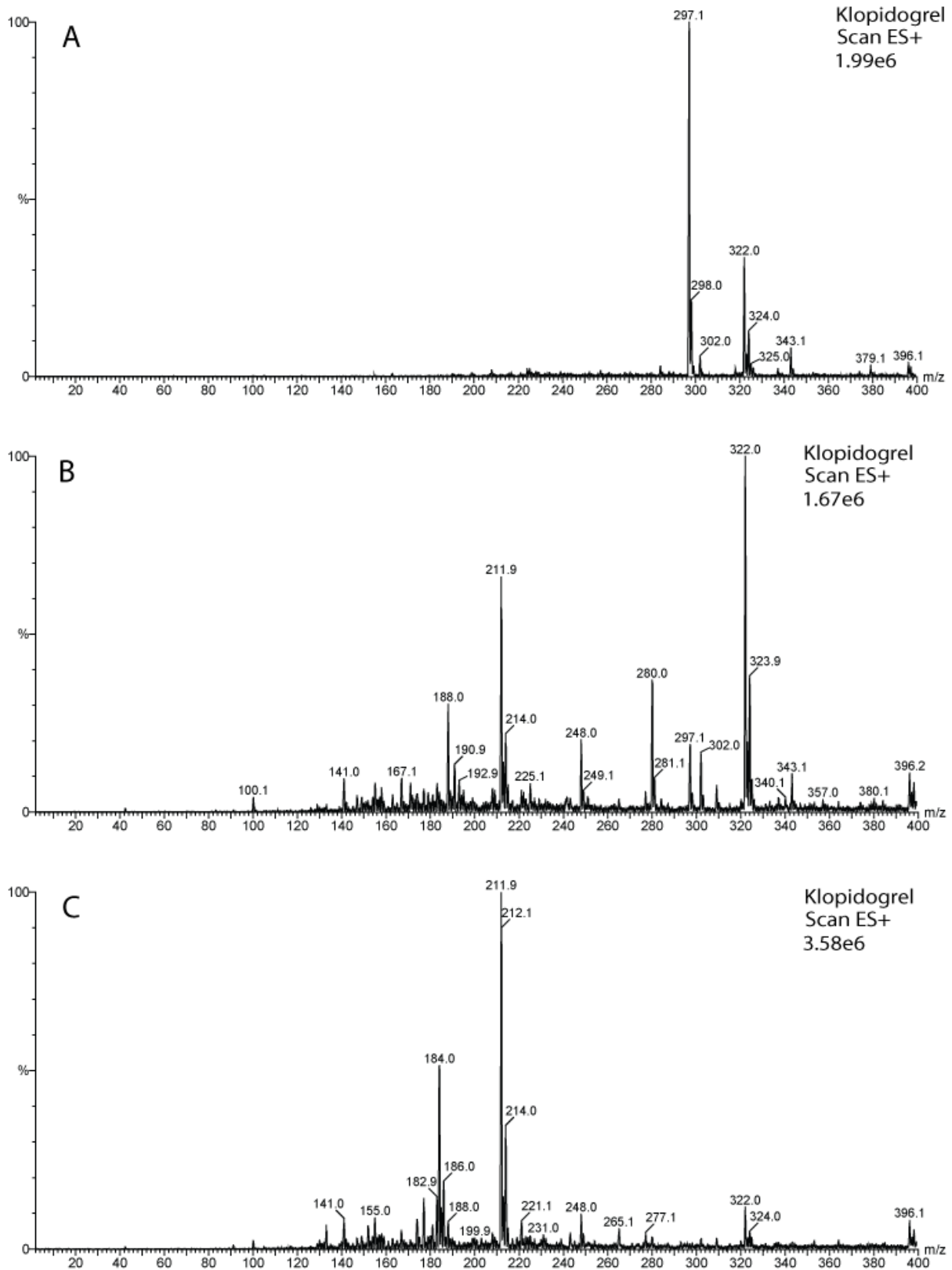
Konsentrasjon (ng ml ⁻¹)	Areal Klopidogrel (322>184)	Areal N-7084 (304,1>191,2)	Areal klopidogrel/ areal N-7084
0,038	15,9	6176,0	0,0026
0,38	1130,9	8396,4	0,1347
0,77	2892,2	9593,6	0,3015
7,66	1434,8	9741,3	0,1473
38,3	4727,6	8996,6	0,5255
76,6	8488,6	7428,9	1,1426



Figur 32: HPLC-MS/MS analyse av serum spiket med klopidogrel (etter utfelling av proteiner med TCA, SPE med metanol som inneholder 0,1 % maursyre som elueringsmiddel, avdampning til tørrhet og reoppløsning i 50 µl metanol:Milli-Q vann:maursyre 40:60:0,1)

3.6 UTVIKLING AV MASSESPEKTROMETRI METODE

3.6.1 MS



Figur 33: Massespektre for protonert kloidogrel ved forskjellig cone voltage, henholdsvis 15 (A), 25 (B) og 50 (C). $[M+H]^+$ er 322.

Utvikling av MS- metode ble gjort som beskrevet i pkt. 2.6.1.

Innen massespektrometri angis massen til ionene av den monoisotopiske massen, hvor denne beregnes ut fra den eksakte massen til atomets dominerende isotop. Et eksempel på dette er klor, hvor ^{35}Cl - isotopen dominerer og utgjør 75,77 %, og ^{37}Cl utgjør 24,23 %. Med at ^{35}Cl naturlig forekommer tre ganger oftere enn ^{37}Cl , vil intensiteten av signalet der ^{35}Cl inngår være tre ganger høyere enn signalet der ^{37}Cl inngår. [15] Klopidogrel er en forbindelse som inneholder et kloratom, og dermed vil en se to topper i massespektret for ionene og fragmentene som inneholder klor. Den ene toppen vil være to masseenheter høyere enn den andre, og forholdet mellom intensiteten til signalene vil være 3:1. I de foregående MS-spektrene er 322,0 m/z verdien der ^{35}Cl - isotopen inngår, og 324,0 (Figur 33 A og C) og 323,9 (Figur 33 B) er m/z verdiene der ^{37}Cl - isotopen inngår. En kan også se at det er et 3:1 forhold mellom intensiteten for disse m/z verdiene i alle spektrene.

Optimale cone voltage for analyttene er angitt i tabellen under.

Tabell 25: Optimale cone voltage funnet ved MS av forbindelsene

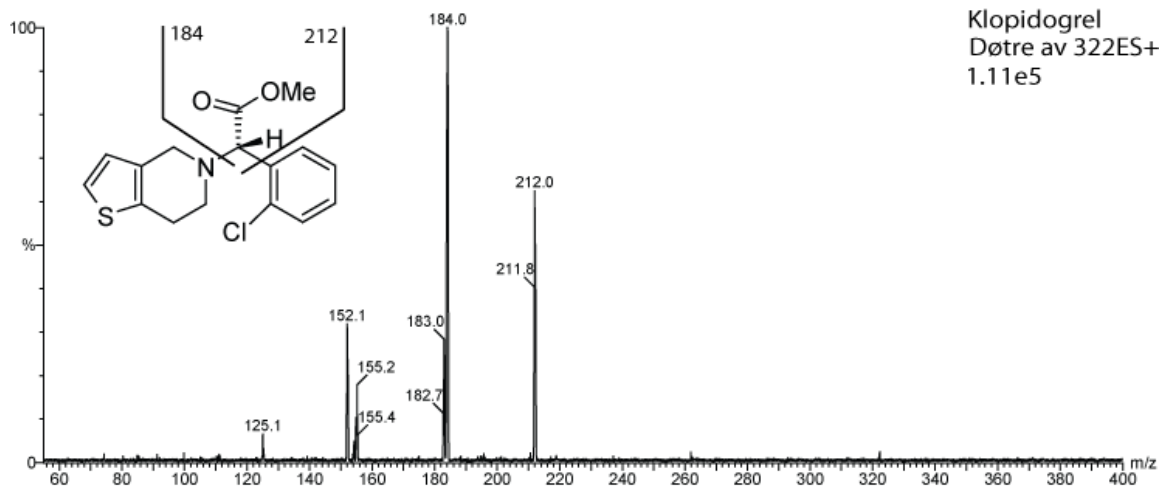
Analytt	$[\text{M} + \text{H}]^+$ (målt verdi) (m/z)	Cone voltage (volt)
Klopidogrel	321,9	25
Tiklopidin	264	25
N-7084	304,1	35

3.6.2 MS/MS

3.6.2.1 Produktionscan

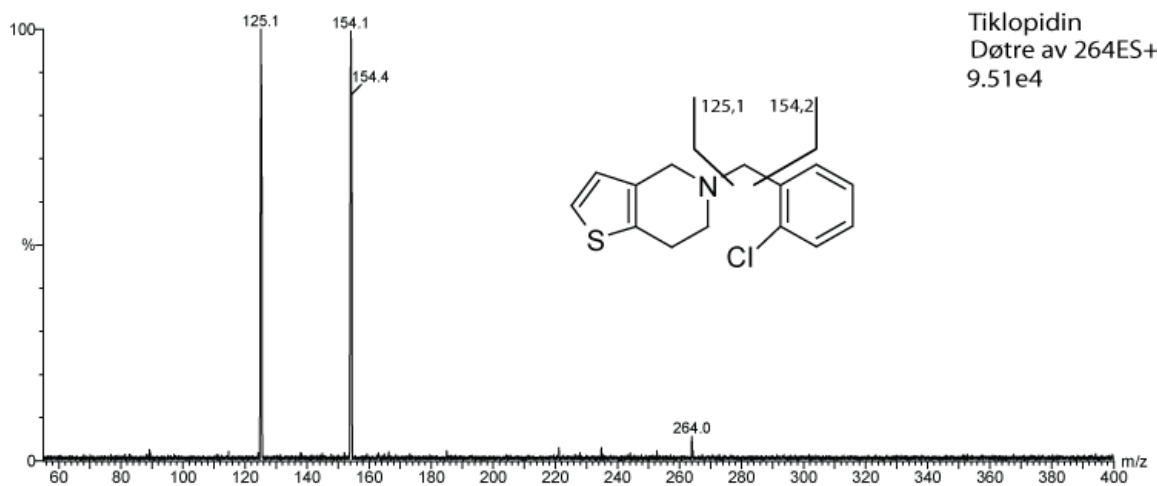
Produktionscan ble utført som beskrevet i pkt. 2.6.2.1, og spektrene for produktionscan med optimal CV og CE for analyttene er angitt i figurene under.

Målt $[M+H]^+$ for klopidogrel er 321,9. Figuren forklarer hvilke bindinger som kan være brutt for å skape de mest intense fragmentationene.



Figur 34: De mest intense produksjonene av protonert klopidogrel ved kollisjonsenergi 21

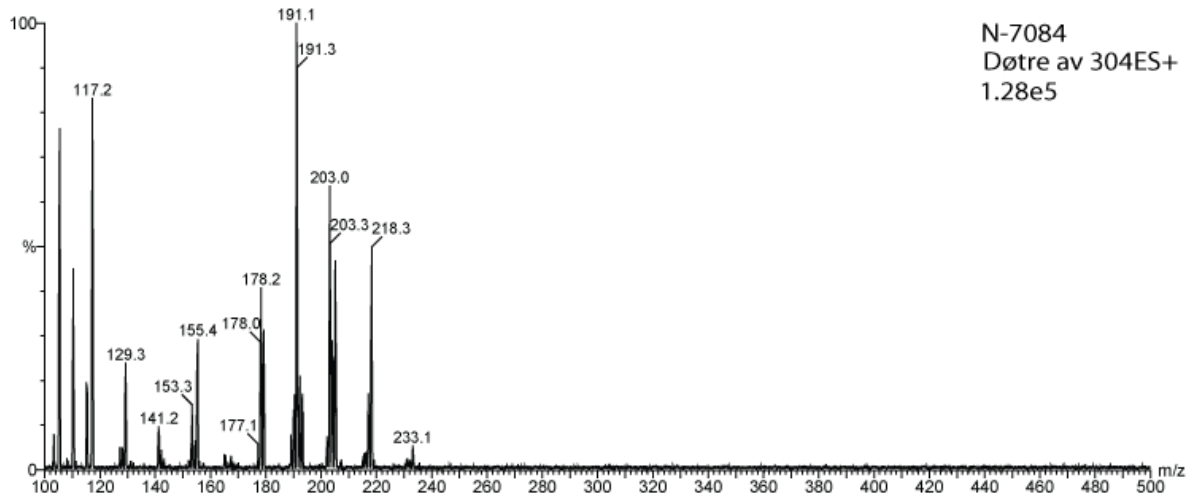
Målt $[M+H]^+$ for tiklopidin er 264,0. Figuren forklarer hvilke bindinger som kan være brutt for å skape de mest intense fragmentationene.



Figur 35: De mest intense produksjonene av protonert tiklopidin ved kollisjonsenergi 21

3. Resultat og diskusjon

Målt $[M+H]^+$ for N-7084 er 304,1.



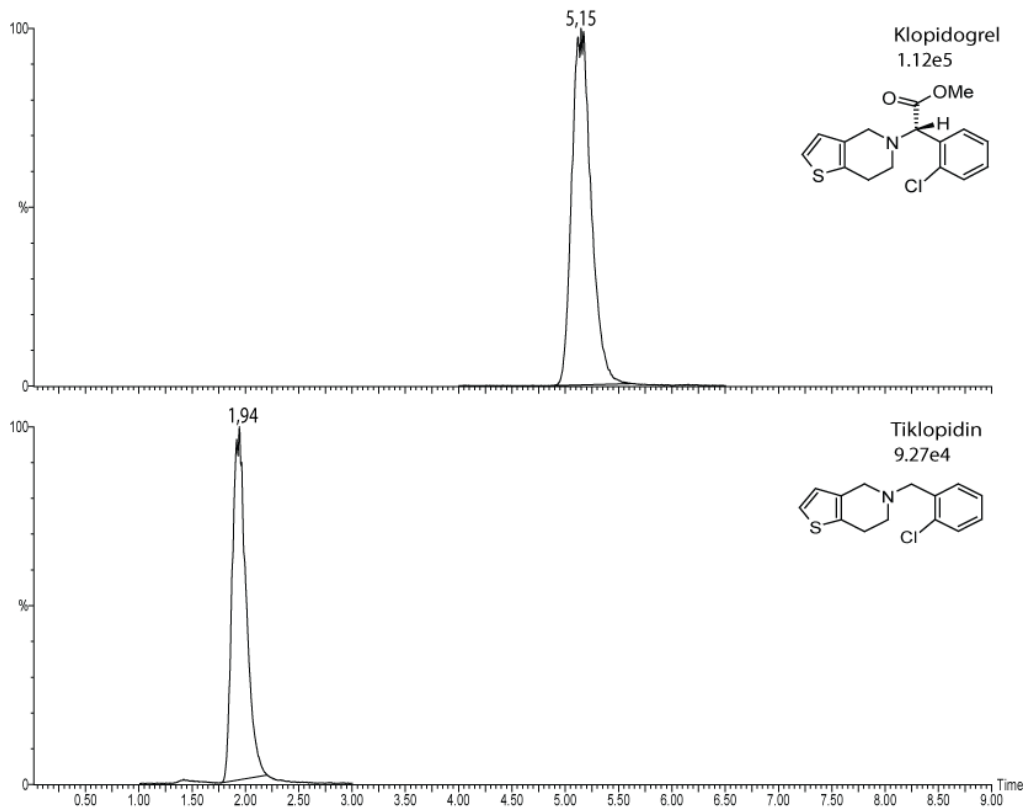
Figur 36: De mest intense produksjonene av protonert N-7084 ved kollisjonsenergi 35

Figur 36 viser at ionestrømmen fra N-7084 er fordelt på et stort antall ioner. Dette er sannsynligvis forklaringen på at det må brukes større mengde N-7084 enn klopidogrel og tiklopidin for å oppnå like store topper i kromatogrammet.

3.6.3 HPLC-MS

3.6.3.1 Utvikling av SIR-metode

SIR- metoden ble utviklet som beskrevet i pkt. 2.6.3.1. Kromatogram for klopidogrel og tiklopidin er angitt nedenfor.



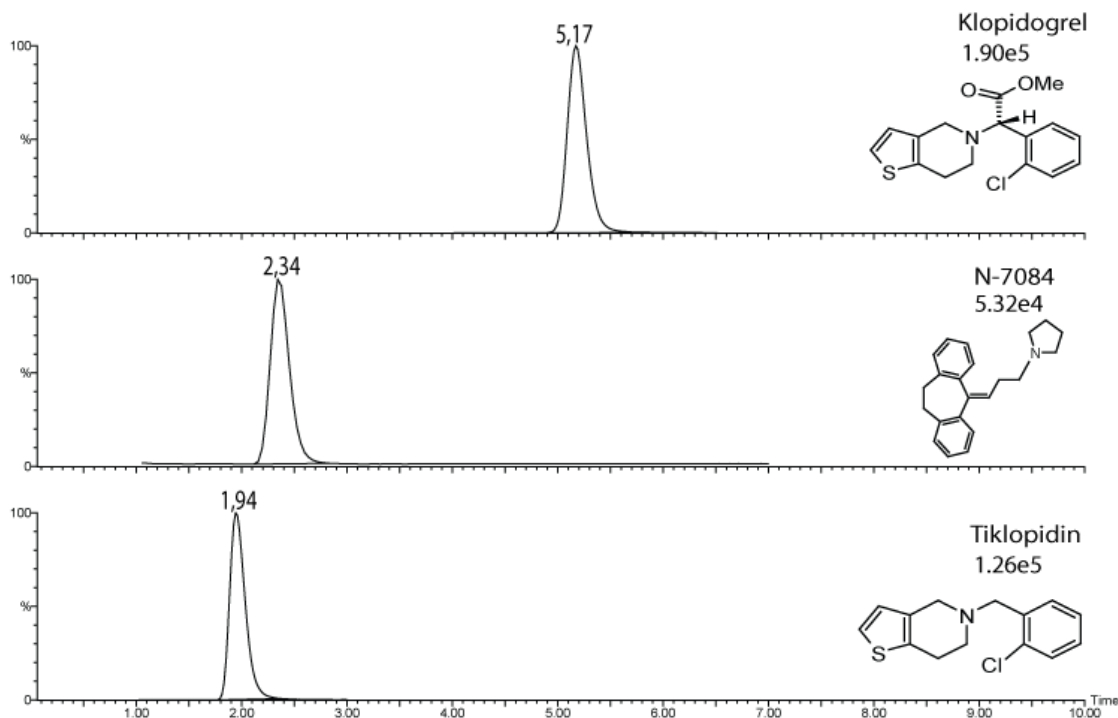
Figur 37: Kromatogram for utvikling av SIR metode for klopidogrel (øverst) og tiklopidin (nederst)

3.6.4 HPLC-MS/MS

3.6.4.1 Utvikling av MRM- metode

MRM- metoden ble utviklet som beskrevet i pkt. 2.6.4.1. Kromatogram for klopidogrel, N-7084 og tiklopidin er angitt nedenfor.

Dette kromatogrammet viser det mulige separasjonsproblemet mellom N-7084 og tiklopidin ved mobilfasesammensetningen som bestod av 40 % A (Milli-Q vann tilsatt 0,1 % maursyre) og 60 % B (90 % acetonitril, 10 % Milli-Q vann og 0,1 % maursyre).



Figur 38: Kromatogram for utvikling av MRM metode for klopidogrel (øverst), N-7084 (midten) og tiklopidin (nederst)

Ved bruk av SIR vil både signalet og støyen være større enn ved bruk av MRM. Med dette vil S/N som oftest være større ved bruk av MRM, og man vil derfor få en mindre verdi for LOD og LOQ ved bruk av MRM enn ved bruk av SIR. I tillegg vil MRM være en sikrere metode for påvisning av analytt da det vil være veldig få andre forbindelser med en m/z verdi for foreldreionet som fragmenteres til produksjoner som gir like m/z verdier. Ved å bruke to datterioner som MS2 låses på, vil selektiviteten økes for en forbindelse med en bestemt molekylmasse, da en annen forbindelse med lik molekylmasse mest sannsynlig ikke vil ha like fragmentioner.

Samtidig vil forholdstallet mellom arealene for de bestemte fragmentene kunne brukes som en sikkerhet da dette forholdstallet holder seg relativt konstant med kun noen få prosent i avvik fra analyse til analyse. Dersom dette avviket blir større eller mindre enn det som er satt som grense vil en ikke kunne si at dette er fragmentene fra den analytten en ønsker å kvantifisere. Dette brukes ofte som en ekstra sikkerhet innen dopingtesting og rettstoksikologi.

Ved oral administrasjon av klopidogrel hos mennesker metaboliseres modersubstansen i høy grad. Grunnet dette er plasmanivåene for modersubstansen lave og dermed veldig vanskelig å kvantifisere. Siden verken modersubstansen eller den aktive metabolitten til klopidogrel er detektert i plasma, vil den farmakodynamiske effekten måles best ved å estimere plateaggregering. Men kvantifisering av den inaktive karboksylsyremetabolitten til klopidogrel kan benyttes som et indirekte mål på å studere klopidogrels farmakokinetikk med at det er denne forbindelsen som hovedsakelig er sirkulerende i plasma. [28] Det vil derfor være naturlig å utvikle en MRM-metode for den inaktive karboksylsyremetabolitten til klopidogrel. Det vil også være nyttig å utvikle en MRM-metode også for den aktive metabolitten dersom det lar seg gjøre å analysere denne. Men da denne forbindelsen kommer under et målbart nivå raskt etter administrering samtidig som forbindelsen er svært ustabil kan dette bli noe vanskelig.

Det er utviklet flere metoder for analyse av klopidogrels inaktive syremetabolitt slik at dette bør kunne la seg gjøre [22, 24-26, 28, 29]. Det er også publisert en artikkel for utvikling og validering av en LC-MS/MS metode for kvantitativ bestemmelse av den aktive thiolmetabolitt til klopidogrel i menneske plasma. Den aktive metabolitten inneholder som nevnt tidligere en thiol gruppe som vil kreve stabilisering i biologiske prøver. Thiolholdige forbindelser er anslått å være ustabil i blod og plasma pga. den funksjonelle gruppens reaktivitet. De danner gjerne disulfidbinding enten med seg selv, med endogene forbindelser som har lav molekylvekt eller med proteiner. Den ustabile aktive metabolitten i blod vil dermed degraderes hurtig etter blodprøvetaking. Ved å tilsette en løsning av den aktive metabolitten til menneske plasma vil den aktive metabolitten degraderes til mindre enn 80 % av startkonsentrasjonen i løpet av 10 minutter. I denne artikkelen ble den aktive thiol gruppen på metabolitten stabilisert ved å benytte den alkylerende forbindelsen 2-bromo-3'methoxyacetophenone til derivatisering. [10] Men om derivatisering av aktiv metabolitt kan knyttes sammen med analyse av klopidogrel og den inaktive karboksylsyremetabolitten er en annen sak.

Den inaktive karboksylsyremetabolitten kan kjøpes kommersielt. Om dette lar seg gjøre for den aktive metabolitten er usikkert, og eventuell syntese av aktiv metabolitt vil dermed kunne være et mulig alternativ.

3.7 ANALYSE AV BLODPRØVER FRA PASIENTER

Analyse av reelle blodprøver fra pasienter ved UNN som viser non-respons for klopidogrel etter PCI ble ikke utført grunnet manglende tilbakemelding fra REK-Nord og mangel på tid.

Ved fremtidig analyse av reelle blodprøver fra pasienter vil det være nyttig å ha et bestemt tidspunkt for blodprøvetaking. På denne måten blir prøvene mer sammenlignbare og det vil være lettere å trekke eventuelle konklusjoner. I litteraturen angis det at konsentrasjonen av klopidogrel selv er $0,00025 \text{ mg l}^{-1}$ 2 timer etter administrering [8]. Dermed er et estimat for den høyeste observerte konsentrasjonen (C_{\max}) av klopidogrels tilgjengelig. Dersom en antatt non-responder får en konsentrasjon av modersubstansen som er mye høyere enn antatt referanseverdi, kan dette være en indikasjon på at det er forstyrrelser i den hepatiske metabolismen og at det er lite modersubstans som omdannes til metabolitt. Det er estimert at 85 % av modersubstansen omdannes til den inaktive metabolitten. Dersom det måles en høyere konsentrasjon av den inaktive metabolitten og konsentrasjon av modersubstans er omtrent som referanseverdien, vil dette indikere redusert omdannelse til aktiv metabolitt. Det vil altså være nødvendig å kvantifisere både modersubstans og inaktiv metabolitt for å kunne fastslå om en pasient er non-responder på grunn av endret metabolisme.

I litteraturen er det eksempler der blodprøvene er tatt 24 timer etter administrering av klopidogrel. [29] 24 timer etter inntak av klopidogrel vil mest sannsynlig modersubstansen være langt under målbart nivå. Modersubstansen er imidlertid detektert i løpet av 12 timer etter siste inntak av klopidogrel [29]. Etter gjentatt dosering med 75 mg klopidogrel er C_{\max} for den inaktive karboksylsyremetabolitten er målt til å være ca 3 mg l^{-1} ca 1 time etter inntak av klopidogrel [8]. Halveringstiden for den inaktive karboksylsyremetabolitten er 8 timer [8]. Det er vist at denne kan detekteres opp til 48 timer etter initiering av terapi [26, 29].

3.8 FRAMTIDIGE ASPEKTER FOR OPPGAVEN

Med tanke på at klopidogrel gjennomgår hepatisk biotransformasjon og omdannes til en aktiv og en inaktiv metabolitt vil det være naturlig å utvikle en MRM- metode også for disse metabolittene. Det er i hovedsak særlig viktig å utvikle en MRM- metode for den inaktive karboksylsyremetabolitten. Dette med tanke på at modersubstansen eller den aktive metabolitten ikke vil kunne detekteres i plasma etter et visst tidspunkt, og med at blodkonsentrasjonen av den inaktive karboksylsyremetabolitten har blitt brukt for å dokumentere den farmakokinetiske profilen til klopidogrel [25]. Ved å ha denne metabolitten til stede i prøven under metodeutviklingen vil informasjonen en erverver seg være nyttig for videre analyse av pasientprøver. For pasienter som viser non-respons vil dette mulig kunne fanges opp dersom pasientene viser et høyere nivå av modersubstansen eller den inaktive metabolitten. Ut fra dette kan det kanskje trekkes en konklusjon om den hepatiske metabolismen hos non-respondere. Det finnes også litteratur som har konkludert med at det vil være et nyttig verktøy å bestemme plasmakonsentrasjonen til klopidogrels karboksylsyremetabolitt for å fange opp dårlig compliance og variabel metabolisme hos pasienter som behandles med klopidogrel [29]. Totalt sett er det publisert flere artikler som beskriver utviklede analysemetoder for analyse av klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitten [22, 24-26, 28, 29]. Ksycinska et al. benyttet en mobilfasesammensetning av acetonitril:vann:maursyre (60:40:0,1 v/v/v), hadde en analysetid lik 12 minutter, en flow av mobilfase lik 0,2 ml/min og et injeksjonsvolum lik 10 µl. Med dette vil den HPLC-MS/MS metoden som er utviklet i denne oppgaven høyst sannsynlig kunne sammenlignes og benyttes for analyse av den inaktive karboksylsyremetabolitten.

Den inaktive karboksylsyremetabolitten kan kjøpes kommersielt, men kan også syntetiseres ved å hydrolysere klopidogrel ved hjelp av natriumhydroksid. Den syntetiserte forbindelsens renhet og identitet kan bekreftes ved bruk av LC-MS. [29] Det ville også vært særdeles nyttig å ha den aktive metabolitten til stede i analysene. Med at denne metabolitten er svært ustabil vil derivatisering være nødvendig [10]. Hvordan derivatisering av aktiv metabolitt vil fungere dersom klopidogrel og inaktiv karboksylsyremetabolitt er til stede er usikkert. Dette ble beskrevet i pkt. 3.6.4.1.

Det vil også være høyst nødvendig å finne en optimal metode for å felle ut proteinene fra serum før videre prøveopparbeidelse slik at utfelling etter reopløsning unngås og for å bryte

eventuell proteinbinding som skjer mellom klopidogrel og plasmaproteiner. Acetonitril i et 2:1 (eller høyere) v/v forhold til serum bør testes først.

Fordeler med fast-fase ekstraksjon er at det er store muligheter for en selektiv eluering av analytt, oppkonsentrering av analytt og det er et lavt løsemiddelforbruk. Ulemper kan være at kolonnen ikke må tørke ut mellom de ulike trinnene i prosessen og samtidig er det en tidkrevende prosess. Både ekstraksjonsprosessen i seg selv og avdampingen av eluatene er svært tidkrevende, og med dette kan en stille seg spørsmål om dette vil være det beste valget av ekstraksjonsmetode for kommersiell bruk. Hvordan metoden for fast-fase ekstraksjon som er benyttet i denne oppgaven vil fungere for metabolittene er uvisst. Et mulig alternativ vil være å teste andre ekstraksjonsformer som kan være mer arbeids- og tidsbesparende.

Innen forskning betegnes ikke en retensjonstid lik 10 minutter som lang, men i rutinebruk vil dette kanskje bli noe langt selv om det vil være situasjonen for noen analytter uansett. Retensjonstiden og analys tiden kan kortes ned ved bruk av kolonner som inneholder små partikler (korte UPLC-kolonner).

Når optimal metode er utviklet bør det utføres flere ekstraksjonsparalleller av analyttene fra serumprøver slik at en får laget en standardkurve som inneholder flere paralleller. På denne måten kan en få beregnet LOD og LOQ også for serumprøver. Ved flere paralleller tilgjengelig vil det også kunne utføres statistiske outliers-tester slik at en får en pekepinn på hvilke verdier som eventuelt bør forkastes. Validering av metoden vil også være nødvendig, særlig med hensyn på klopidogrel og klopidogrels metabolitt(er).

Til slutt bør metoden benyttes for analyse av reelle blodprøver fra både respondere og non-respondere av klopidogrel.

3.9 NYE P2Y₁₂ RESEPTOR ANTAGONISTER

Det er totalt sett tre nye P2Y₁₂ reseptor antagonister under utvikling. Prasugrel er et tredjegerasjons thienopyridin derivat som er en irreversibel hemmer av P2Y₁₂ reseptoren, og som klopidogrel er også dette et prodrug. Farmakodynamisk skal prasugrel være bedre enn klopidogrel, og samtidig skal det være en lavere insidens av non-respons for prasugrel.

[11, 30]

3. Resultat og diskusjon

Ved administrering av 75 mg klopidogrel tar det 5-7 dager før det oppnås en konstant platehemmende effekt, mens dette oppnås i løpet av tre dager ved administrering av 10-15 mg prasugrel. Prasugrel opprettholder også en høyere og mer stabil hastighet av platehemming *in vivo*. [8, 30]

AZD 6140 (Astra-Zeneca) og cangrelor (Medicines Company) er potente og reversible hemmere av P2Y₁₂ reseptorer. Begge disse legemidlene skal gi en bedre og mer stabil platehemmende effekt enn klopidogrel. Grunnet deres raske og korte virkning er de beregnet som en tilleggsbehandling når det er ønskelig med en hurtig og maksimum hemming av ADP induisert plateaggregering, som ved stentimplantasjon. [11]

Prasugrel og AZD 6140 skal administreres peroralt, mens cangrelor imidlertid skal gis parenteralt. [11, 30]

Alle de tre nykommerne er i fase III studier. [11]

4 KONKLUSJON

I arbeidet med denne oppgaven ble det utviklet en HPLC-MS/MS metode som ga god kromatografisk separasjon av tiklopidin, N-7084 og klopidogrel. Det ble analysert både vandige prøver av klopidogrel og tiklopidin, og serumprøver som ble tilsatt klopidogrel, tiklopidin og internstandard N-7084. Utfelling av proteiner i serum ble benyttet ved hjelp av både acetonitril og 10 % TCA løst i Milli-Q vann. Det ble analysert prøver direkte etter proteinutfelling, etter oppkonsentrering ved avdamping og reoppløsning etter proteinutfelling og etter SPE sammen med oppkonsentrering.

SPE fungerte ikke optimalt, samtidig som det er en arbeidskrevende prosess, og andre ekstraksjonsteknikker som LLE eller LPME bør mulig testes. Med dette kan en også avgjøre hvilken ekstraksjonsteknikk som eventuelt vil gi best recovery, er best egnet tidsmessig og som dermed bør benyttes videre.

Pga. utfelling av proteiner etter oppkonsentrering både med og uten SPE, vil det være nødvendig å optimalisere metoden for utfelling av proteiner fra serum. Det første som bør testes er acetonitril i et 2:1 (eller høyere) (v/v) forhold til serum.

Det er også nødvendig å utvikle en MRM- metode for analyse av klopidogrels inaktive karboksylsyremetabolitt. Eventuell syntese, derivatisering og analyse av den aktive thiolmetabolitten bør også utføres dersom det lar seg gjøre.

Videre bør metoden optimaliseres og valideres, særlig med hensyn på klopidogrel og klopidogrels metabolitt(er). Det bør utføres flere paralleller for prøveopparbeidelse av serumprøver slik at LOD og LOQ også kan beregnes for serumprøver.

Til slutt bør metoden benyttes for analyse av reelle blodprøver fra pasienter som både responderer normalt på klopidogrel og de som viser non-respons.

5 REFERANSER

1. Jenum, A.K., et al., *Risikofaktorer for hjerte- og karsykdom og diabetes gjennom 30 år*. Tidsskrift for Den norske legeförening, 2007. **Nr. 19 / 4. oktober 2007**.
2. Sherwood, L., *Human physiology : from cells to systems*. 6th ed. 2007, Belmont, Calif.: Thomson Brooks/Cole. s. 385-404.
3. Rang, H.P., *Pharmacology*. 5th ed. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone. s. 314-327.
4. Gurbel, P.A. and U.S. Tantry, *Drug Insight: clopidogrel nonresponsiveness*. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2006. **3(7)**: p. 387-395.
5. Gachet, C. and B. Hechler, *The Platelet P2 Receptors in Thrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31(02)**: p. 162-167.
6. Gurbel, P.A., M.J. Antonino, and U.S. Tantry, *Antiplatelet treatment of cardiovascular disease: a translational research perspective*. Pol Arch Med Wewn, 2008. **118(5)**: p. 289-97.
7. *Norsk legemiddelhandbok for helsepersonell*. <http://www.legemiddelhandboka.no/>. (02.05.2009)
8. Statens legemiddelverk. *Preparatomtale (SPC) Plavix*. <http://www.legemiddelverket.no/spc/> (sist endret 06/2007)
9. Oqueli, E., M. Hiscock, and R. Dick, *Clopidogrel Resistance*. Heart, Lung and Circulation, 2007. **16(Supplement 3)**: p. S17-S28.
10. Takahashi, M., et al., *Quantitative determination of clopidogrel active metabolite in human plasma by LC-MS/MS*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **48(4)**: p. 1219-24.
11. Gurbel, P.A. and U.S. Tantry, *Clopidogrel resistance?* Thromb Res, 2007. **120(3)**: p. 311-21.
12. Savi, P. and J.M. Herbert, *Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31(2)**: p. 174-83.
13. Rønning, M. and Nasjonalt folkehelseinstitutt, *Reseptregisteret 2004-2007*. Legemiddelstatistikk. 2008, Oslo: Folkehelseinstituttet. s. 52.
14. Suh, J.W., et al., *Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel*. CMAJ, 2006. **174(12)**: p. 1715-22.
15. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, [Bergen]: Fagbokforl. s. 139-148, 156-163, 167-182, 213- 224, 239-274, 286-300, 493-496, .
16. Souverain, S., S. Rudaz, and J.L. Veuthey, *Protein precipitation for the analysis of a drug cocktail in plasma by LC-ESI-MS*. J Pharm Biomed Anal, 2004. **35(4)**: p. 913-20.
17. Polson, C., et al., *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **785(2)**: p. 263-75.
18. Jensen, E., *Personlig meddelelse*. 2009.
19. Hoffmann, E.d. and V. Stroobant, *Mass spectrometry : principles and applications*. 3rd ed. 2007, Chichester: Wiley. s. 43-55, 52, 88-91, 175.
20. Ashcroft, A.E., *Ionization methods in organic mass spectrometry*. RCS analytical spectroscopy monographs. 1997, Cambridge: Royal Society of Chemistry. s. 10, 14, 13-15, 17-19, 28-37.

21. Harris, D.C., *Exploring chemical analysis*. 4th ed. 2009, New York: Freeman. s. 119-120.
22. Souri, E., et al., *Validated HPLC method for determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma and its application to a pharmacokinetic study*. Biomed Chromatogr, 2006. **20**(12): p. 1309-14.
23. Ramakrishna V. S. Nirogi, V.N.K., Manoj Shukla, Koteshwara Mudigonda, Santosh Maurya, Ravikumar Boosi,, *Quantification of clopidogrel in human plasma by sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2006. **20**(11): p. 1695-1700.
24. Ksycinska, H., P. Rudzki, and M. Bukowska-Kiliszek, *Determination of clopidogrel metabolite (SR26334) in human plasma by LC-MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006. **41**(2): p. 533-539.
25. Bahrami, G., B. Mohammadi, and S. Sisakhtnezhad, *High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: Application to a bioequivalence study*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **864**(1-2): p. 168-72.
26. Mitakos, A. and I. Panderi, *Determination of the carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2004. **505**(1): p. 107-114.
27. Rodriguez Robledo, V. and W.F. Smyth, *A study of the analytical behaviour of selected new molecular entities using electrospray ionisation ion trap mass spectrometry, liquid chromatography, gas chromatography and polarography and their determination in serum at therapeutic concentrations*. Anal Chim Acta, 2008. **623**(2): p. 221-30.
28. Singh, S.S., et al., *Estimation of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in Wistar rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study*. Journal of Chromatography B, 2005. **821**(2): p. 173-180.
29. Mani, H., et al., *Determination of clopidogrel main metabolite in plasma: a useful tool for monitoring therapy?* Ther Drug Monit, 2008. **30**(1): p. 84-9.
30. Riley, A.B., M.J. Tafreshi, and S.L. Haber, *Prasugrel: a novel antiplatelet agent*. Am J Health Syst Pharm, 2008. **65**(11): p. 1019-28.

6 APPENDIKS

6.1 KJEMIKALIER

6.1.1 Utgangstoffer

Tablettprøver: Klopido­grel (Plavix® «Sanofi Pharma Bristol-Myers Squibb»)

Batch. nr: 2285

Tiklopidin (Ticlid® «Sanofi aventis»)

Batch. nr: A18

Renstoffer: Klopido­grel hydrogensulfat «Sigma»

Tiklopidin hydroklorid «Sigma»

N-7084 HCl «Lundbeck»

6.1.2 Kjemikalier

Tabell 26: Kjemikalieliste

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
Acetonitril	Isocratic grade for liquid chromatography	Merck
Maursyre	Pro analysi	Merck
Metanol	Pro analysi	Merck
Saltsyre 37 %	Pro analysi	Merck
Tri­klo­red­diksyre	Pro analysi	Merck

6.1.3 Serum

Det ble benyttet medikamentfritt serum for tillaging av prøver. Serum ble lagret i fryseboks inntil analyse.

6.1.4 Vann

Alt vann som ble brukt i forsøkene var 18Ω millipore vann rens­et med Milli-Q-system (Millipore Corp).

6.2 UTSTYRSLISTE

Tabell 27: Utstysliste

	Utstyr	Leverandør
<i>Til SPE:</i>	Supelco visiprep vakuummanifol	Supelco
	Sep-pak® plus C18 kolonne	Waters
	Plastsprøyte 5 ml	Bd plastipak
<i>Til HPLC:</i>	Waters 2695 Separations module	Waters
	Waters Masslynx 3.4 software	Waters
	X-bridge™ C18-kolonne 2,1x150mm, 3,5µm	Waters
	Sample vials 12 x 32 mm recovery (Snap Cap med silikonseptum)	Waters
	Sample vials 12 x 32 mm (skrukork og silikonseptum)	Waters
<i>Til MS:</i>	Micromass Quattro LC massespektrometer	Waters
	Waters Masslynx 3.4 software	Waters
	Harvard syringe pump 11	Harvard Instruments
	Hamilton HPLC sprøyte 100 µl	Hamilton
<i>Pipetter</i>	Finnpipette 1-5 ml	Thermo scientific
	Finnpipette 200-1000 µl	Thermo scientific
	Finnpipette 50-200 µl	Thermo scientific
	Finnpipette 5-50 µl	Thermo scientific
	Pipettespisser	Thermo scientific
<i>Vekt</i>	Sartorius BP 221S analysevekt	KEBO Lab AS
<i>Annet:</i>	Biofuge fresco eppendorfsentrifuge	Heraeus instruments
	Function Line labofuge 400e	Heraeus instruments
	Heidolph Reax top vortex	Heidolph
	Varmeblokk	Grant Instruments
	Plastrør for Function Line labofuge (15 ml, 120 x 17 mm)	Sarstedt
	Eppendorfrør 1,5 ml	Brand GMBH
	Pasteur pipette i glass	VWR
	Plastsprøyte 1 ml	Bd plastipak
	Bd Microlance 27G x ¾" Nr.20 0,4 mm x19 mm	Becton Dickinson (BD)

6.3 TILLAGING AV PRØVER TIL STANDARDKURVE I VANDIGE LØSNINGER

Klopidogrel:

Stamløsning:	766 000 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 1:	76 600 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 2:	7660 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 3:	766 ng ml ⁻¹

Tiklopidin:

Stamløsning:	3530 000 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 1:	353 000 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 2:	17650 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 3:	1765 ng ml ⁻¹
Bruksløsning 4:	882,5 ng ml ⁻¹

Konsentrasjon I.S: 299,6 ng ml⁻¹ → 1,498 ng/ 5µl

Mengde I.S i hver prøve: 30 µl av bruksløsning med konsentrasjon 9987,3 ng ml⁻¹

Navn	Klopidogrel					Tiklopidin						
	Kons. klop (ng ml ⁻¹)	Mengde klop.inj (ng/ 5µl)	Volum klopidogrel bruksløn. 1	Volum klopidogrel bruksløn. 2	Volum klopidogrel bruksløn. 3	Kons tiklo (ng ml ⁻¹)	Mengde tiklo inj. (ng/ 5µl)	Volum tiklopidin bruksløn. 1	Volum tiklopidin bruksløn. 2	Volum tiklopidin bruksløn. 3	Volum tiklopidin bruksløn.4	Volum løsem. (µl)
12	14,96	0,0748	-	-	20 µl	13,24	0,0662	-	-	-	15 µl	935
11	29,92	0,1496	-	-	40 µl	26,48	0,1324	-	-	-	30 µl	900
10	59,84	0,2992	-	-	80 µl	52,95	0,2648	-	-	-	60 µl	830
9	119,69	0,5985	-	16 µl	-	109,76	0,5488	-	-	60 µl	-	894
8	239,38	1,1969	-	32 µl	-	219,53	1,0977	-	-	125 µl	-	813
7	478,75	2,3938	-	64 µl	-	441,69	2,2085	-	25 µl	-	-	881
6	957,50	4,7875	-	128 µl	-	882,5	4,4125	-	50 µl	-	-	792
5	1915	9,575	25 µl	-	-	1765	8,825	-	100 µl	-	-	845
4	3830	19,15	50 µl	-	-	3512,44	17,5622	-	199 µl	-	-	721
3	7660	38,3	100 µl	-	-	7060	35,3	20 µl	-	-	-	850
2	15320	76,6	200 µl	-	-	14120	70,6	40 µl	-	-	-	730
1	30640	153,2	400 µl	-	-	26481,62	132,4081	75 µl	-	-	-	495

6.4 TILLAGING AV PRØVER TIL STANDARDKURVE VED SPE I SERUM

Klopidogrel:

Stamløsning: 766 000 ng ml⁻¹

Bruksløsning 1: 766 ng ml⁻¹

Bruksløsning 2: 76,6 ng ml⁻¹

Bruksløsning 3: 7,66 ng ml⁻¹

Bruksløsning 4: 0,766 ng ml⁻¹

Tiklopidin:

Stamløsning: 3530 000 ng ml⁻¹

Bruksløsning 1: 878,11 ng ml⁻¹

Bruksløsning 2: 87,81 ng ml⁻¹

Bruksløsning 3: 8,78 ng ml⁻¹

Bruksløsning 4: 0,878 ng ml⁻¹

Klopidogrel						Tiklopidin							
Kons. klop ng ml ⁻¹	Mengde klop inj. (ng/ 5µl)	Volum klopidogrel bruksløn 1	Volum klopidogrel bruksløn 2	Volum klopidogrel bruksløn 3	Volum klopidogrel bruksløn 4	Kons tiklo ng ml ⁻¹	Mengde tiklo inj (ng/ 5µl)	Volum tiklo bruksløn 1	Volum tiklo bruksløn 2	Volum tiklo bruksløn 3	Volum tiklo bruksløn 4	Volum Serum (µl)	Volum MeCN (µl)
0,38	1,92x10 ⁻³	-	-	50 µl	-	0,44	2,2 x10 ⁻³	-	-	50 µl	-	325	325
0,77	3,83x10 ⁻³	-	-	100 µl	-	0,88	4,4 x10 ⁻³	-	-	100 µl	-	275	275
7,66	0,0383	-	100 µl	-	-	8,78	0,0429	-	100 µl	-	-	275	275
38,3	0,1915	50 µl	-	-	-	43,91	0,22	50 µl	-	-	-	325	325
76,6	0,383	100 µl	-	-	-	87,81	0,44	100 µl	-	-	-	275	275

Konsentrasjon I.S: 250 ng ml⁻¹ → 1,25 ng/ 5µl

Mengde I.S i hver prøve: 250 µl av bruksløsning med konsentrasjon 1000 ng ml⁻¹ N-7084

6.5 TILLAGING AV PRØVER TIL STANDARDKURVE VED SPE I SERUM 2

Klopidogrel:

Stamløsning: 766 000 ng ml⁻¹

Bruksløsning 1: 766 ng ml⁻¹

Bruksløsning 2: 76,6 ng ml⁻¹

Bruksløsning 3: 7,66 ng ml⁻¹

Bruksløsning 4: 0,766 ng ml⁻¹

Tiklopidin:

Stamløsning: 3530 000 ng ml⁻¹

Bruksløsning 1: 878,11 ng ml⁻¹

Bruksløsning 2: 87,81 ng ml⁻¹

Bruksløsning 3: 8,78 ng ml⁻¹

Bruksløsning 4: 0,878 ng ml⁻¹

Klopidogrel						Tiklopidin							
Kons. klop ng ml ⁻¹	Mengde klop inj. (ng/ 5µl)	Volum klopidogrel bruksløn 1	Volum klopidogrel bruksløn 2	Volum klopidogrel bruksløn 3	Volum klopidogrel bruksløn 4	Kons tiklo ng ml ⁻¹	Mengde tiklo inj (ng/ 5µl)	Volum tiklo bruksløn 1	Volum tiklo bruksløn 2	Volum tiklo bruksløn 3	Volum tiklo bruksløn 4	Volum Serum (µl)	Volum MeCN (µl)
0,0077	3,83x10 ⁻⁵	-	-	-	10 µl	8,8x10 ⁻³	4,4 x10 ⁻⁵	-	-	-	10 µl	365	365
0,038	1,92x10 ⁻⁴	-	-	-	50 µl	0,044	2,2 x10 ⁻⁴	-	-	-	50 µl	325	325
0,38	1,92x10 ⁻³	-	-	50 µl	-	0,44	2,2 x10 ⁻³	-	-	50 µl	-	325	325
0,77	3,83x10 ⁻³	-	-	100 µl	-	0,88	4,4 x10 ⁻³	-	-	100 µl	-	275	275
7,66	0,0383	-	100 µl	-	-	8,78	0,0429	-	100 µl	-	-	275	275
38,3	0,1915	50 µl	-	-	-	43,91	0,22	50 µl	-	-	-	325	325
76,6	0,383	100 µl	-	-	-	87,81	0,44	100 µl	-	-	-	275	275

Konsentrasjon I.S: 250 ng ml⁻¹ → 1,25 ng/ 5µl

Mengde I.S i hver prøve: 250 µl av bruksløsning med konsentrasjon 1000 ng ml⁻¹ N-7084

6.6 TUNINGSVERDIER FOR MS

Tabell 28: Tuningverdier for MRM (ES+)

	Verdier
Capillary (kV)	3,30
Cone (V)	variabel
Extractor (V)	2
RF- lens (V)	0,3
Source temperature (°C)	100
Desolvation temperature (°C)	250
Cone gas flow (L/Hr)	
Desolvation gas flow (L/Hr)	1000

Det er kun cone voltage og kollisjonsenergi som er forskjellige for de ulike forbindelsene, de andre verdiene vil ellers være like

Tabell 29: Tuningverdier for analyse

	Verdier
LM resolution	15
HM resolution	15
Ion energy 1	1,0
Entrance	0
Collision energy (eV)	variabel
Exit	0
LM 2	14,5
HM 2	14,5
Ion energy 2	1,0
Multiplier (V)	600

