

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM.

**IONPÅRMEDIERT VÆSKEFASE MIKROEKSTRAKSJON.
EVALUERING AV NY METODE FOR EKSTRAKSJON AV
HYDROFILE LEGEMIDLER.**

HANNE SOFIE ANTHONSEN



**Avdeling for legemiddelanalyse,
Farmasøytisk Institutt,
Det matematisk-naturvitenskaplige Fakultet,
Universitetet i Oslo.
Oslo 2003**

IONPARMEDIERT VÆSKEFASE MIKROEKSTRAKSJON.
EVALUERING AV NY METODE FOR EKSTRAKSJON AV
HYDROFILE LEGEMIDLER.

HANNE SOFIE ANTHONSEN

Arbeidet ble utført fra oktober 2002 til oktober 2003 ved
Avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Professor Knut Einar Rasmussen

Forord

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere Stig Pedersen-Bjergaard og Knut Einar Rasmussen for meget god veiledning gjennom hele hovedfagsåret. De har vært behjelpelig med råd både i forbindelse med laboratoriearbeidet og oppgaveskrivingen.

Tung Si Ho fortjener også en stor takk for veiledning og gode råd i forbindelse med laboratoriearbeidet.

Videre vil jeg takke Siri Johannesen ingeniør ved Avdeling for Farmakologi, Farmasøytisk Institutt, for hjelp i forbindelse med blodprøvetakingen. Retter også en stor takk til alle velvillige ansatte og studenter som stilte opp og bidro med biologiske prøver.

I løpet av våren og sommeren satte jeg stor pris på selskap fra min venninne og medstudine Olaug, da vi tilbrakte kvelder og helger sammen på labben. Er også takknemlig for den koselige stemningen som har vært på hovedfagskontoret mellom meg og ”gutta”, Jonas og Bjørn.

Til slutt vil jeg takke alle ansatte ved avd. H for et inkluderende miljø og en god arbeidsplass. Jeg vil savne alle de fine samtalene vi har hatt både faglig og privat i løpet av hovedfagsåret.

Oslo, 2003

Hanne Sofie Anthonsen

Innhold

Forkortelser	3
Sammendrag	4
1 Innledning	6
1.1 Bakgrunn og målsetting.....	6
1.2 Teori.....	8
1.2.1 Væskefase mikroekstraksjon (LPME).....	8
1.2.2 Kapillærelektroforese (CE).....	15
2 Eksperimentelt	19
2.1 Analysestandarder, kjemikalier og utstyr.....	19
2.2 Løsninger og buffere.....	23
2.3 Biologiske prøver.....	26
2.4 Prøveopparbeidelse.....	27
2.5 Kapillærelektroforese.....	29
2.6 Validering.....	30
2.7 Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor.....	32
3 Resultater og diskusjon	33
3.1 Karakterisering av analyserte legemidler.....	33
3.2 Innledende forsøk.....	35
3.2.1 Ekstraksjonsutbytter med stavfiber og loopfiber.....	35
3.2.2 Optimalisering av donorfasevolum.....	39
3.2.3 Optimalisering av organisk fase.....	40
3.2.4 Tid/utbytte kurver.....	41
3.2.5 Ekstraksjonsutbytter og oppkonsentreringsfaktorer for modellsustansene.....	44
3.3 Analyse av biologiske prøver.....	47
3.3.1 Ekstraksjon av legemidler fra urin.....	47
3.3.2 Valg av intern standard.....	53
3.3.3 Validering av ionparmediert LPME av urinprøver.....	54
3.3.4 Ekstraksjon av legemidler fra plasma.....	57
3.3.5 Validering av ionparmediert LPME av plasmaprøver.....	58

4 Konklusjon.....	62
5 Referanseliste.....	63

Forkortelser

CE	Kapillærelektroforese (Capillary electrophoresis)
CZE	Kapillær sone elektroforese (Capillary zone electrophoresis)
EF	Oppkonsentreringsfaktor (Enrichment factor)
EOF	Elektroosmotisk flow
GC	Gasskromatografi (Gas chromatography)
HPLC	Væskekromatografi (High performance liquid chromatography)
I.D.	Indre diameter
IS	Intern standard
kV	Kilovolt
LC-MS	Væskekromatografi-massespektrometri (Liquid chromatography-Mass spectrometry)
LPME	Væskefase mikroekstraksjon (Liquid phase microextraction)
O.D.	Ytre diameter
PDA-detektor	Fotodiodearray-detektor (Photodiode array detector)
Psi	Pounds per square inch (1 psi = 68,93 mbar = $6,893 \times 10^3$ Pa)
Rpm	Runder per minutt
RSD	Relativt standardavvik
S/N	Signal/støy
UV-detektor	Ultrafiolett-detektor (Ultraviolet detector)

Sammendrag

Væskefase mikroekstraksjon (LPME) er en ny og effektiv metode til opprensing og oppkonsentrering av legemidler fra biologiske prøver. Metoden er utviklet og patentert av Pedersen-Bjergaard, Rasmussen og Krogh ved Avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo. I LPME ekstraheres analyttene gjennom en porøs, hul polypropylenfiber impregnert med et organisk løsemiddel, og videre inn i en vandig akseptorfase i fiberens hulrom. Det har tidligere blitt fokusert på ekstraksjon av hydrofobe legemidler ved passiv diffusjon i LPME-systemet [1-10]. Nylig ble en annen transportmekanisme utprøvd for ekstraksjon av hydrofile legemidler [11]. Det ble benyttet en ionpardanner som transportmolekyl slik at et hydrofobt ionparkompleks ble dannet mellom den hydrofile forbindelsen og transportmolekylet. Ionparkomplekset ble ekstrahert gjennom veggene av en hul, porøs polypropylenfiber impregnert med et organisk løsemiddel. På kontaktflaten mellom organisk fase og vandig akseptorløsning i fiberens hulrom, ble forbindelsen frigjort gjennom ionebytting. Ekstraktene ble analysert direkte ved hjelp av kapillærelektroforese.

Kun ett arbeid som omhandler ionparmediert LPME er publisert. For å generere mer kunnskap om faktorer som er involvert i transportmekanismen ble studier av mekanismen gjennomført. De innledende forsøkene ble utført med vandige fortyngninger av syv hydrofile, basiske legemidler som modellsubstanser. Fenypropolanolamin, metaraminol, cimetidin, morfin, sotalol, atenolol og practolol ble valgt som modellsubstanser. Amfetamin ble inkludert som hydrofob sammenliknings-substans. Ionparmediert LPME har aldri blitt validert med hensyn på biologiske prøver. Metoden ble derfor testet i biologiske matrikser som urin og plasma for å undersøke om matrikskomponenter kunne interferere med ekstraksjonsprosessen. Biologiske prøver tilsatt metaraminol, cimetidin og atenolol ble ekstrahert med ionparmediert LPME. Urin er en variabel matriks og analyse av urinprøver viste at komponenter i urin påvirker transportmekanismen. Kreatinin er en basisk forbindelse som utskilles i store mengder i urin sammen med en rekke andre forbindelser [12,13]. Endogene syrer og baser kan virke konkurrerende med hensyn på binding til ionpardanneren og analyttene, og transportmekanismen kan hemmes ved analyse av konsentrerte urinprøver. Undersøkelser viste at ved å benytte en intern standard med liknende struktur som analytten kunne forskjellene i ekstraksjonsutbyttene mellom ulike prøver utjevnes. Det er nødvendig at forbindelsen som velges som intern standard har liknende kjemiske egenskaper som analytten

fordi ekstraksjonsutbytter, hastighet og presisjon varierer med forbindelsenes egenskaper. Plasma syntes ikke å inneholde interfererende komponenter som kunne hindre transporten av legemidlene eller skape varierende utbytter mellom ulike prøver. En foreløpig validering av metoden med hensyn på metaraminol med etilefrin som intern standard ble gjennomført i urin og plasma. Metoden viste linearitet i konsentrasjonsområdet 0,8 til 40,0 µg/ml i urin ($r = 0,9998$) og i konsentrasjonsområdet 0,4 til 40,0 µg/ml i plasma ($r = 0,9996$). Nøyaktigheten ved analyse av 2,0, 10,0 og 20,0 µg/ml metaraminol i tre ulike urinprøver varierte fra 0,2 til 10,0 % avvik fra sann konsentrasjon, og i tre ulike plasmaprøver fra -8,5 til 8,0 % avvik fra sann konsentrasjon. Intra-dag presisjon (RSD) for de tre ulike konsentrasjonsnivåene varierte fra 0,7 % til 12,7 % i urin og fra 0,8 % til 6,1 % i plasma. Reproduserbarheten ble testet for prøver fra tre ulike individ i løpet av tre dager. Konsentrasjonsnivåene valgt var 2,0, 10,0 og 20,0 µg/ml metaraminol. Relativt standardavvik for urinprøvene varierte fra 0,8 til 2,0 % og fra 1,4 til 6,9 % for plasmaprøvene.

1 Innledning

1.1 Bakgrunn og målsetting

Farmasøytisk bioanalyse omfatter analyse av legemidler og metabolitter i biologiske matrikser som fullblod, plasma, serum og urin [14]. Prøveopparbeidelse er det hastighetsbestemmende leddet i bioanalyse [15]. Væske-væske ekstraksjon er den eldste ekstraksjonsmetoden som ofte benyttes under prøveopparbeidelsen [16]. Metoden gir stor grad av opprensing, høy grad av oppkonsentrering etter inndamping eller tilbakeekstraksjon og er billig. Men metoden har ulemper som stort forbruk av løsemidler, er arbeidskrevende og vanskelig å automatisere [15]. Nylig utviklet og patenterte Stig Pedersen-Bjergaard, Mette Krogh og Knut E. Rasmussen (Avdeling for legemiddelanalyse, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo) et nytt mikroskala konsept for rask og enkel oppkonsentrering og opprensing av legemidler fra biologisk materiale [7,10]. Konseptet kalles væskefase mikroekstraksjon (LPME) og er under kommersiell utvikling i samarbeid med firmaet Varian Inc. (Lake Forest, CA, USA). Væskefase mikroekstraksjon er direkte kompatibel med væskrokromatografi (HPLC), gasskromatografi (GC) og kapillærelektroforese (CE) [1-4,7-10,17].

LPME kan benyttes som tofase eller trefase system. I tofase system ekstraheres nøytrale hydrofobe analytter fra en vandig løsning over i et organisk løsemiddel som er immobilisert i porene og i hulrommet av en porøs, hul polypropylenfiber. Mikroekstraktet er direkte kompatibelt med GC [10,17]. Trefase LPME tillater ekstraksjon av hydrofobe komponenter med ioniserbare grupper fra en vandig prøveløsning gjennom porene i fiberveggen hvor et organisk løsemiddel er immobilisert, og over i en vandig akseptorfasen i fiberens hulrom. Den vandige akseptorfasen kan injiseres direkte i HPLC, LC-MS eller CE. Både to- og trefase LPME som beskrevet over, er basert på passiv diffusjon. Ved passiv diffusjon justeres pH i prøveløsningen slik at analyttene er uionisert. Analyttene ekstraheres gjennom et organisk løsemiddel som er immobilisert i porene av en hul polypropylenfiber. For trefase LPME justeres pH i den vandige akseptorfasen slik at analyttene blir ionisert. Ladningen hindrer analyttene i å diffundere tilbake til organisk fase [1,4,7,10]. Videreutvikling av LPME-systemet har ført til at andre transportmekanismer enn passiv diffusjon kan benyttes. Ett tidligere arbeid har vist at ved bruk av ionpaddannere oppkonsentreres og opprenses også hydrofile komponenter fra biologiske prøver. Hydrofile, basiske komponenter med log P-

verdier omkring 1 ble valgt som modellsubstanser [11]. Ionparmediert transport i LPME kan gjøre systemet egnet for analyse av polare legemidler og ulike legemiddelmetabolitter i pasientprøver. Studie av legemiddelmetabolisme er av svært stor betydning innen farmakologisk forskning og involverer kjemisk bestemmelse av både legemidler og deres ulike metabolitter [14]. Utvikling og optimalisering av ekstraksjonsbetingelsene for humane prøver kan frembringe en prøveopparbeidelsesmetode som er godt egnet til bruk i detaljert metabolismekartlegging.

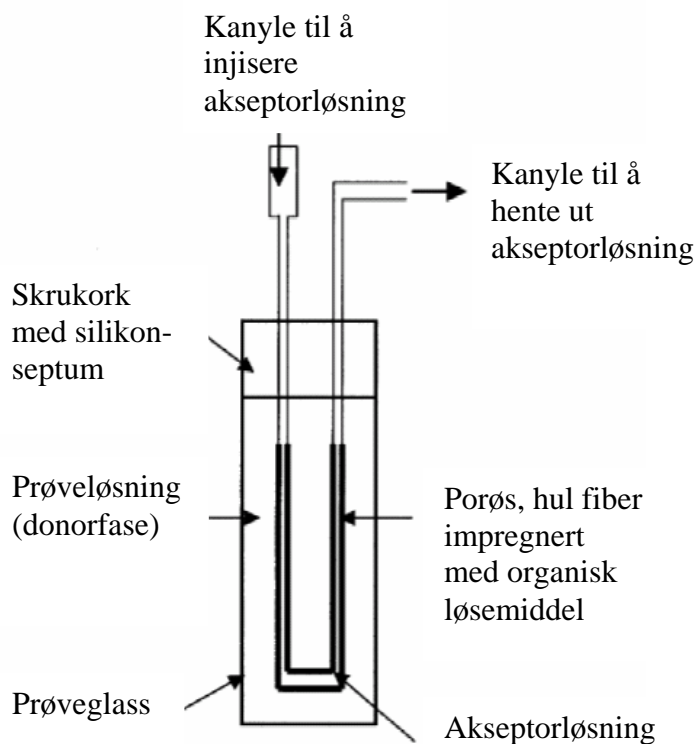
Målet med oppgaven var å generere kunnskap om mekanismen som ligger til grunn for ionparmediert transport av hydrofile komponenter. Metoden hadde aldri blitt validert med hensyn på biologiske prøver. Det var derfor ønskelig å teste systemet i matriser som plasma og urin for å undersøke om matrisekomponenter kunne interferere med transportmekanismen. En evaluering av systemet var nødvendig før ytterligere arbeid blir utført for å optimalisere metoden til bruk i ulike applikasjoner.

1.2 Teori

1.2.1 Væskefasemikroekstraksjon (LPME)

Prøveopparbeidelse har som hensikt å rense og eventuelt oppkonsentrere aktuelle stoffer i prøven slik at de kan separeres og detekteres. Rensingen kan gjennomføres ved å fjerne uønskede komponenter i prøven, eller ved å isolere de aktuelle stoffene fra prøveløsningen. Væske-væske ekstraksjon og fastfase ekstraksjon er de viktigste metodene til å isolere, rense og oppkonsentrere stoffer fra biologiske væsker [16]. Vanlige prøvevolum er 0,5 til 5,0 ml, og analyttene samles normalt i 0,2 til 10,0 ml løsemiddel etter væske-væske ekstraksjon eller eluering fra fastfase ekstraksjonskolonne [17]. For å oppnå ytterligere oppkonsentrering kan løsemidlet dampes av og analyttene løses i mindre mengde løsemiddel. Disse prosessene er tidkrevende og kan føre til bruk av store mengder løsemidler. På grunn av dette har prinsippene for mikroekstraksjon blitt utviklet.

Ekstraksjonsenheten



Figur 1-1: Ekstraksjonsenhet for væskefase mikroekstraksjon [5].

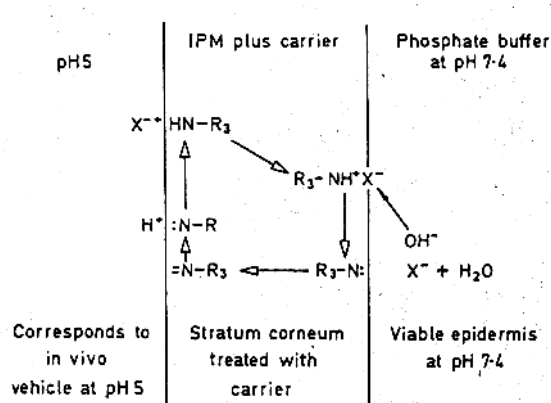
Ekstraksjonsenheten som ble benyttet i de første publikasjonene om LPME består av et prøveglass med skrukork med silikonseptum, figur 1-1. Prøveløsningen fylles i et prøveglass sammen med eventuelle andre reagenser som er nødvendig for pH justering eller fortynning av prøven. To kanyler føres gjennom en skrukork med silikonseptum. Endene av kanylene er forbundet med en polypropylenfiber. Den ene kanylen benyttes til å fylle akseptorløsning i polypropylenfiberens hulrom, mens den andre benyttes til å hente ut akseptorløsning etter fullført ekstraksjon. Fiberen har tradisjonelt hatt en indre diameteren på 600 μm , veggtykkelse på 200 μm og porestrørrelse på 0,2 μm . Lengden har variert fra 6-8 cm [1,4-7,9,11,17,18]. Fiberen impregneres med et organisk løsemiddel slik at en organisk fase dannes i porene av fiberen. Fiberens hulrom fylles med akseptorløsning og fiberen plasseres i prøveløsningen. Prøvene settes til ekstraksjon på vibrator. Etter fullført ekstraksjon fjernes akseptorfase for videre analyse.

LPME som tofase eller trefase system

LPME kan benyttes som tofase eller trefase system. I tofase system ekstraheres nøytrale analytter fra en vandig løsning til en organisk akseptorfase. pH i donorfasen justeres slik at analyttene av interesse er deionisert. Et organisk løsemiddel som ikke er blandbart med vann immobiliseres i porene på en porøs, hul polypropylenfiber. Det samme organiske løsemidlet utgjør også akseptorfase i fiberens hulrom. Ved å deionisere analyttene i prøveløsningen nedsettes løseligheten. Det fører til at analyttene ekstraheres fra vandig til organisk løsning. Ved fullført ekstraksjon er mikroekstraktet direkte kompatibelt med GC [5,17]. I trefase system er det ønskelig å ekstrahere analytter fra en vandig løsning gjennom porene i veggen av en porøs hul fiber som er impregnert med organisk løsemiddel til en vandig akseptorfase i fiberens hulrom. pH i donorfase justeres i forhold til egenskapene til analyttene som skal ekstraheres. Analyttene må deioniseres for å redusere deres løselighet i donorfase. Den organiske fasen i porene av fiberen fungerer som en effektiv barriere mellom donor- og akseptorfase. Fiberen fylles med en vandig løsning som har en pH hvor analyttene ioniseres. Analyttene må ha høyere løselighet i akseptorløsningen enn i organisk fase for å hindre at analyttene fanges i organisk fase. Fordi volum av akseptorløsningen i fiberen er lite sammenliknet med volum av donorfase, oppkonsentreres analyttene i akseptorfase. Det vandige mikroekstraktet kan analyseres direkte ved hjelp av HPLC eller CE [1-10].

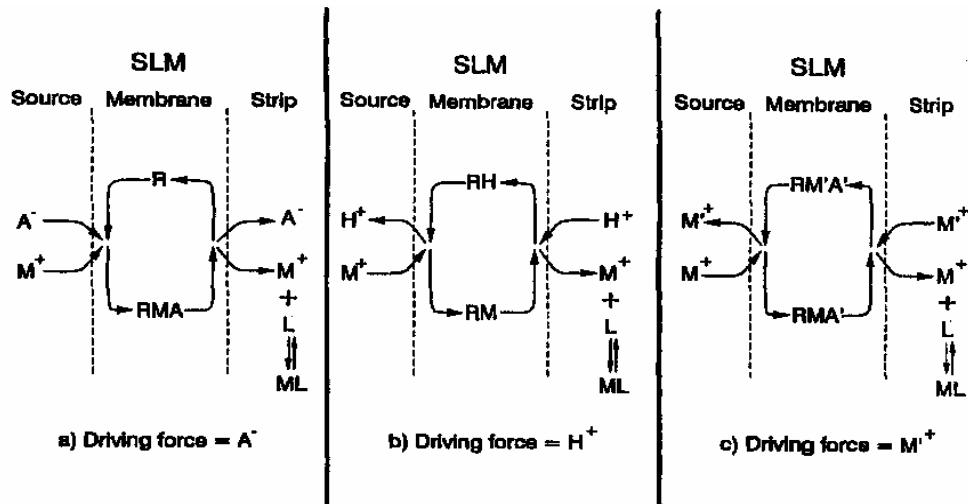
Ionparmediert væskefase mikroekstraksjon

Ionparmediert transport har tidligere blitt utnyttet i ulike farmasøytiske og industrielle anvendelser. Mekanismene involvert i disse transportsystemene har variert. To eksempler nevnes her. I et forsøk på å øke perkutan penetrasjon av natrium salisylat ble det benyttet azone, en langkjedet hydrofob forbindelse med et tertiært amin. Hudoverflaten er svak sur med en pH-verdi mellom 4,2 og 5,6 mens pH i de dypere hudlagene er 7,4. En kunstig membran impregnert med fettstoff og azone skulle simulere en epidermal barriere og en pH gradient som tilsvarte den fysiologiske (5,0 til 7,4) ble dannet over membranen, figur 1-2. Studiene viste at det langkjededede aminet skapte en signifikant økning i fluksen av salisylat over den kunstige membranen. Det ble konkludert med at azone og salisylat dannet et ionparkompleks som diffunderte over membranen med pH gradienten som drivkraft til transporten [19].



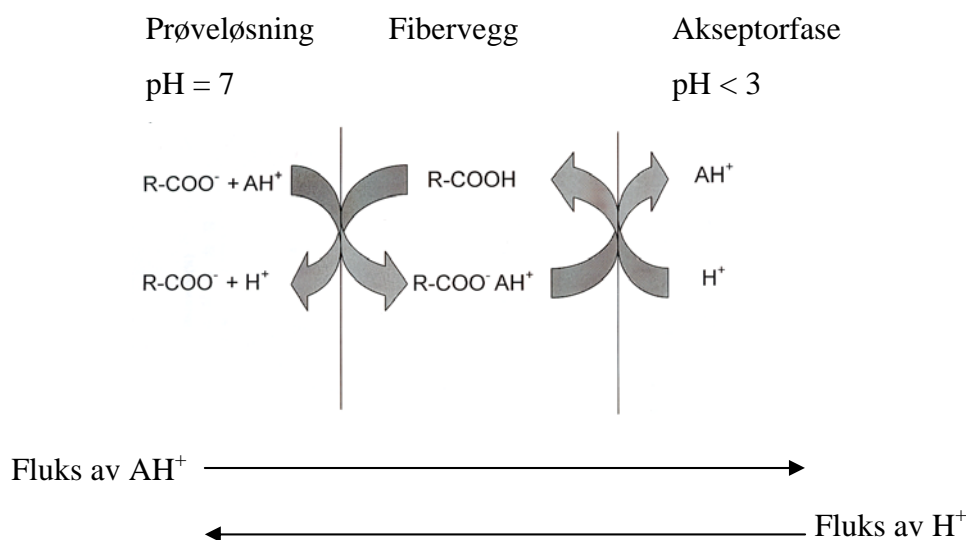
Figur 1-2: Transportskjema for salisylat over en kunstig lipid membran [19].

Ved kvalitetskontroll av vann foretas det analyse av spormetaller i vannet. Til dette har det blitt utviklet en metode bestående av en tynn makroporøs hydrofob membran impregnert med et organisk løsemiddel [20]. Membranen skilte to vandige faser. Den ene vandige fasen var prøveløsningen med metallionene som skulle analyseres. Et komplekseringsreagens var tilsatt det organiske løsemiddelet i membranen. Komplekseringsreagenset ble bundet selektivt til metallionet. I den andre vandige fasen ble metallionene samlet opp. Oppsamlingsløsningen inneholdt et nytt komplekseringsreagens som ble bundet sterkere til metallionet enn komplekseringsreagenset i organisk fase, figur 1-3. Transporten av metallionet kunne være protondrevet eller motiondrevet med anion eller kation. Ved å bruke akseptorløsninger som hadde lavt volum, ble metallet oppkonsentrert.



Figur 1-3: Mekanisme for transport av metallioner over lipid membran [20].

Ionparmediert transport kan også utnyttes i LPME-systemet. Polare analytter er vanskelig å ekstrahere passivt i et trefase LPME-system på grunn av deres dårlige løselighet i organiske løsemidler og liten forskjell i løselighet i sure og basiske vandige løsninger. Dette bidrar til å gjøre LPME-systemet selektivt med hensyn på hydrofobe forbindelser [11]. Men ionpardannere gjør det allikevel mulig å ekstrahere hydrofile analytter fra en vandig løsning gjennom en fibervegg impregnert med organisk løsemiddel til en vandig akseptorfase i fiberens hulrom [11]. Transport av hydrofile analytter ved hjelp av ionpardannere utføres ved en pH i donorfasen hvor både analytten og ionpardanneren er ionisert. Ekstraksjonen deles i fire ulike steg. Prøveløsningen tilsettes en bufferløsning som inneholder ionpardanneren. Bufferen justerer pH i donorfasen slik at både analytt og ionpardanner er ionisert. Et hydrofobt ionparkompleks kan da dannes. Når dette komplekset er dannet må komplekset i neste steg diffundere inn i porene av fiberen og gjennom den organiske fasen. Komplekset bidrar til at analytten blir transportert over den organiske fasen. I det tredje steget skal analytten frigjøres i akseptorfase. På kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorløsningen frigjør ionpardanneren analytten gjennom ionebytte. Akseptorfase inneholder motjoner i overskudd slik at ionpardanneren forblir et elektronøytralt kompleks etter analytten er frigjort i akseptorløsningen. Analytten fanges som et salt i akseptorfase, og et stort overskudd av motjoner sørger for at analyttene ikke tilbakeekstraheres. I det siste steget diffunderer det nye ionparet over til donorfasen hvor ionpardanneren gir fra seg motionet slik at et nytt analyttion kan bindes til denne. Det er transportmekanismen i denne motion-koblede-transporten som er drivkraften i massetransport over fiberveggen [11]. Figur 1-4 viser en modell for ionparmediert ekstraksjon av en polar, basiske analytt med en karboksylsyre som ionpardanner.



A = analytt

R-COOH = karboksylsyre

Figur 1-4: Ekstraksjon av polar, basisk analytt i LPME ved bruk av ionpardanner [11].

For at ionparmediert LPME skal fungere må flere faktorer vurderes.

Ionpardanneren:

Tidligere studier av ionparmediert transport gjennom lipofile membraner har vært basert på hydrofobe ionpardannere løst i den organiske fasen [19,20]. I LPME er både donor- og akseptorfase stillestående, og kontaktflaten mellom prøveløsningen og organisk fase vil være liten. Det er publisert ett arbeid som omhandler ionparmediert LPME. Det arbeidet viste at å løse ionpardanneren i organisk fase gav lave utbytter [11]. For å optimalisere ekstraksjonen utføres den med ionpardanneren i prøveløsningen ved en pH hvor både analytt og ionpardanner er ionisert. pH-kontroll i prøveløsningen er derfor viktig. I tilfeller hvor analytten er basisk gir for høy pH deprotonering av analytten, og for lav pH gir protonering av ionpardanneren. Begge tilfellene fører til lavere ekstraksjonsutbytter [11]. Egenskapene og konsentrasjonen av ionpardanneren er viktig for ionparmediert transport. Ionpardanneren må inneholde en funksjonell gruppe med motsatt ladning av analytten. Den må også være lett løselig i prøveløsningen slik at den kan danne et elektronøytralt ionparkompleks med analyttene. Tilstrekkelig høy konsentrasjon av ionpardanneren vil gi høye utbytter. Men dersom konsentrasjonen av ionpardanner blir for høy vil donorfase og organisk fase mettes.

Det fører til løselighetsproblemer med utfelling av ionpardanner i akseptorfase og lave utbytter [11]. For at akseptorløsningen skal kunne injiseres direkte i HPLC, LC-MS eller CE kan den ikke inneholde interfererende substanser eller substanser som kan forårsake ionesuppresjon i LC-MS. Det kreves derfor at ionpardanneren er uløselig i akseptorfase. Ulike karboksylsyrer har blitt evaluert som ionpardannere på grunn av deres dårlige løselighet i sur akseptorløsning [11]. Morfin og practolol var valgt som modellsubstanser. Studien viste at ionpardannerens hydrofobisitet og løselighet i prøveløsningen var avgjørende. Ionpardanneren må være hydrofob slik at ionparkomplekset som dannes blir tilstrekkelig hydrofob til å entre den organiske fasen. Men dersom ionpardanneren er for hydrofob, vil dens lave løselighet ved nøytral pH begrense bruken av den. Utfelling og lave utbytter vil da observeres. Resultatene i studien viste at oktansyre gav de høyeste ekstraksjonsutbyttene. Heksansyre var for hydrofil til å gi høye utbytter, mens dekansyre var for hydrofob [11].

Organisk løsemiddel:

Den organiske fasen må være dårlig løselig i vann for å kunne danne en effektiv barriere mellom vandig donor- og akseptorfase. Hydrofobisiteten av organisk fase er av stor betydning. Dersom løsemidlet er for hydrofilt vil det kunne lekke ut i de vandige fasene og dens rolle som barriere vil ikke fungere. Hvis den derimot er for hydrofob, vil fordeling av ionparkomplekset inn i organisk fase kunne nedsettes [11]. Det er derfor avgjørende å benytte en organisk fase hvor ionparkomplekset har høy fordelingskoeffisient. Det vil gi høye ekstraksjonsutbytter av analytten. For å hindre at akseptorløsningen inneholder interfererende substanser fra prøveløsningen, bør disse ha lav fordelingskoeffisient til organisk fase. Det er viktig at ionparkomplekset som dannes er stabilt i det organiske løsemidlet, og forblir stabilt gjennom fiberveggen slik at analyttene frigjøres ved kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorløsningen via ionebytte. Dersom komplekset ikke er stabilt, brytes ionebindingen og ionene forsvinner raskt ut i donorfase etter inntreden i organisk fase. Organiske løsningsmidler som har lav viskositet favoriseres i LPME-systemet fordi høyere fluks av ionparkompleks gjennom porene av fiberen gir kortere ekstraksjonstider [11].

Akseptorfases sammensetning:

Drivkraften bak massetransport over fiberveggen skapes av gradienten av motioner fra akseptor- til prøveløsningen [11]. Sterke syrer tilsatt akseptorløsningen danner et stort

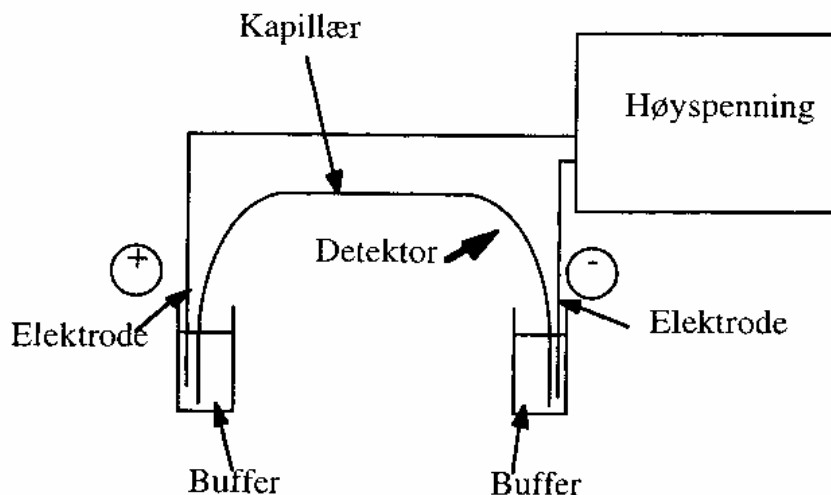
overskudd av protoner som erstatter analyttene i ionparkomplekset ved kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorløsningen. Motionene nøytraliserer ionpardanneren. Ionpardanneren diffunderer gjennom porene i fiberen og løses i prøveløsningen hvor prosessen gjentas. Et overskudd av protoner er nødvendig for å hindre at analyttene danner ionpar med ionpardanneren og tilbakeekstraheres til organisk fase. Akseptorløsninger med ulik konsentrasjon av saltsyre og maursyre har blitt studert [11]. Optimalt utbytte var høyere ved bruk av saltsyre enn ved bruk av maursyre. Årsaken kan være at konsentrasjonen av protoner er høyere ved bruk av saltsyre fordi saltsyre er en sterkere syre.

Fordeler med ionparmediert LPME

LPME med bruk av ionpardanner gjør det mulig å rense og oppkonsentrere hydrofile analytter. Metoden vurderes å være enkel og billig. Ekstraksjonsmetoden har høy kapasitet. Det vil si opptil førti prøver kan ekstraheres parallelt og ekstraktene er direkte kompatible med HPLC og CE. Kostnadene knyttet til hver ekstraksjonsenhet er lav og hver enkelt enhet benyttes til kun en ekstraksjon. Det eliminerer eventuell krysskontaminasjon og carry-over effekter. Men lite arbeid er utført med hensyn på ionparmediert LPME av biologiske prøver. Det er derfor nødvendig å teste systemet i biologiske systemer for å undersøke om matrikskomponenter kan påvirke transportmekanismen.

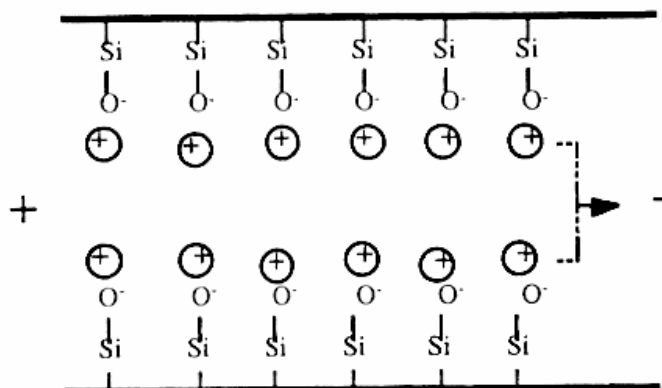
1.2.2 Kapillærelektroforese (CE)

I CE separeres analyttene i et væskefylt kapillærrør. Figur 1-5 viser prinsippskisse for CE.



Figur 1-5: Prinsippskisse for CE [21].

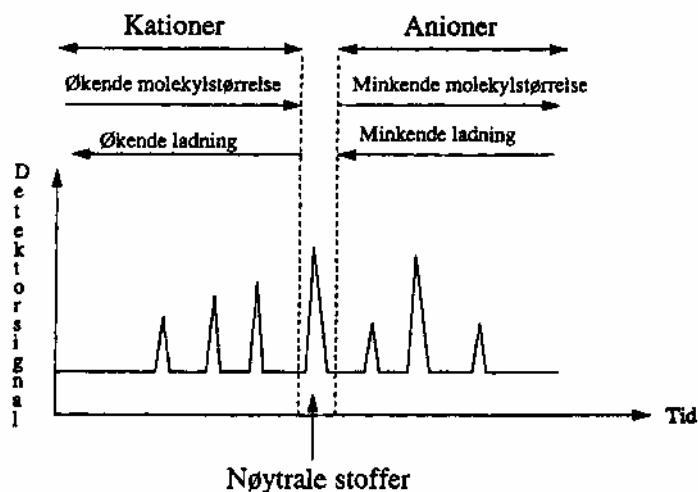
Drivkraften bak separasjonen er spenningen som legges over kapillæret [16]. Kapillær sone elektroforese (CZE) er den enkleste formen for CE, og kan benyttes til å separere ladde forbindelser. Kapillæret fylles da med en vandig buffer hvor stoffene som ønskes analysert er ionisert. Når prøven er injisert ved inngangen av kapillæret, settes høyspenning på for å starte separasjonen. Ved $\text{pH} > 2$ skaper høyspenningen en væskestrøm i kapillæret kalt elektroosmotisk flow (EOF), figur 1-6. Denne væskestrømmen transporterer analyttene mot detektoren [21].



Figur 1-6: Prinsippskisse for EOF [21].

Veggene i kvartskapillæret er dekket med silanol-grupper. Dersom pH i separasjonsbufferen er høyere enn ca. 2-3, er silanol-gruppene ionisert. Kapillærveggen er da negativt ladd. Frie kationer i separasjonsbufferen legger seg langs veggen og danner et motionlag som balanserer den negativt ladde kapillærveggen. Når høyspenning legges på, trekkes det kationiske motionlaget mot utløpet av kapillæret på grunn av elektrostatiske tiltrekking til anoden. Kationene er hydratiserte. Dette fører til at bevegelse av motionlaget får hele væsken inne i kapillæret til å bevege seg under analysen. På denne måten skapes EOF [21].

Kationer migrerer før nøytrale forbindelser og anioner på grunn av elektrostatiske tiltrekking til anoden ved kapillærets utløp. Kationene separeres etter ladning og størrelse. Større forbindelser migrerer langsommere på grunn av høy friksjon i væskemediet. Mindre forbindelser vandrer dermed raskere gjennom kapillæret og migrasjonstidene blir kortere. Molekylenes ladning har også betydning for migrasjonshastigheten. Kationiske forbindelser med høy ladning vandrer raskere fordi de oppnår sterkere elektrostatiske tiltrekking til anoden [21].



Figur 1-7: Migrasjonsrekkefølge for kationer, nøytrale stoffer og anioner [21].

I et elektroferogram er de første toppene kationiske forbindelser som finnes i prøven, figur 1-7. Migrasjonstiden øker med økt molekylstørrelse og minkende ladning. Deretter finnes det en topp for alle nøytrale forbindelser i prøven. Nøytrale forbindelser kan ikke separeres og de vises derfor som en enkel topp. Etter de nøytrale forbindelsene følger de anioniske stoffene på. For anioner øker migrasjonstiden med minkende molekylstørrelse og økende ladning. For

små anioner kan den elektrostatiske tiltrekkingen mot katoden bli så kraftig at de ikke vandrer gjennom kapillæret. Store anioner trekkes i liten grad motsatt EOF på grunn av stor motstand i væskemediet. Mindre anioner og anioner med høy ladning bremses kraftigere opp i forhold til EOF og har derfor høyere migrasjonstider [21].

CZE er en enkel teknikk for å separere ladde forbindelser, og det er en svært aktuell separasjonsmetode fordi de fleste legemidler inneholder ioniserbare grupper [21].

Instrumentering

Kapillær:

Separasjon i CE foregår i et trangt kvartskapillær. Den indre diameteren er ofte 50 eller 75 μm og vanlig lengde er 10-70 cm. Kvartskapillærer er sprø og knekker lett. Utsiden er derfor belagt med et tynt lag av polyimid. Innsiden er vanligvis ubehandlet og inneholder et stort antall silanolgrupper [21].

Injeksjon:

Innføring av prøven gjøres ved hjelp av hydrodynamisk injeksjon. Hydrodynamisk injeksjon utføres ved å legge eksternt trykk ved innløpet, ved å danne vakuum ved utløpet eller etter "hevert"- prinsippet [21,22].

Høyspenningskilde:

Drivkraften for separasjonen er høyspenningskilden. For å få reproducerbare analyser må spenningskilden gi konstant spenning over tid. Spenningen opereres vanligvis i området 10-30 kV. Analysehastigheten kan reguleres ved å forandre spenningen [21].

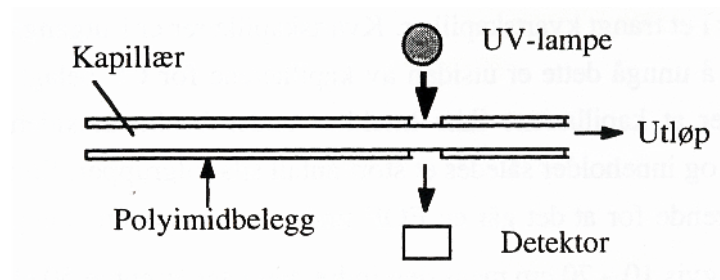
Temperatur:

Konstant injeksjonsvolum og separasjonen av analyttene er temperaturavhengig. Det er derfor viktig å ha temperaturkontroll av kapillæret under elektroforesen. De fleste instrumenter er utstyrt med temperaturkontroll basert på kjøling med luft eller væske [21,22].

Deteksjon:

Analyttene detekteres normalt med UV-detektor. "On-column detection" gjennomføres ved å fjerne polyimidbelegget i et lite vindu nær utløpsenden av kapillæret. Fra UV-detektoren

sendes UV-lys gjennom vinduet og svekkelsen av lyset måles på baksiden av kapillæret ved hjelp av en detektor, figur 1-8.



Figur 1-8: Prinsipp for "on-column" UV-deteksjon [21].

Absorpsjonen av UV-lys baserer seg på Beers lov

$$A = a \times b \times c$$

A – målt absorbans

a – analyttens absorptivitet (konstant)

b – lysveien

c – konsentrasjon av analytt

På bakgrunn av Beers lov kan kvantitative bestemmelser av separerte forbindelser foretas [21]. En UV-detektor, basert på fotodiodearrayteknikken, kan ta opp UV-spektere for hver av de separerte stoffene. UV-spekterene kan i kombinasjon med migrasjonstider benyttes for en sikker identifikasjon av de separerte forbindelsene [21].

2 Eksperimentelt

2.1 Analysestandarder, kjemikalier og utstyr

Analysestandarder, kjemikalier og utstyr anvendt i arbeidet står oppført i tabell 2-1, 2-2 og 2-3.

Tabell 2-1: Analysestandarder anvendt i arbeidet.

Analysestandarder	Leverandør
Atenolol	Sigma, St.Louis, MO, USA
(±) Sotalol hydroklorid	Sigma, St.Louis, MO, USA
Morfin hydroklorid	Norsk Medisinaldepot, Oslo, Norge
Practolol	Imperial Chemical Industries Limited, Macclesfield, Cheshire, Storbritannia
Fenylpropanolamin hydroklorid	Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, USA
Cimetidin	Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA
Amfetamin sulfat	Norsk Medisinaldepot, Oslo, Norge
Metaraminol bitartrat	Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA
Etilefrin hydroklorid	Boehringer, Ingelheim, Tyskland
Kreatinin hydroklorid	Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA

Tabell 2-2: Kjemikalier anvendt i arbeidet.

Kjemikalier	Kvalitet	Leverandør
Etanol	96%	Arcus, Oslo, Norge
Metanol	>99,8%	Merck, Darmstadt, Tyskland
1-oktanol	>99%	Merck, Darmstadt, Tyskland
1-nonanol	98%	Sigma-Aldrich Co., St.Louis, MO, USA
n-dekanol	>98%	Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA
n-oktansyre	>99%	Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA
Natrium oktanat	>98%	Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, USA
1-oktansulfonat (Na-salt)	-	Sigma, St.Louis, MO, USA
Saltsyre, 37 %	Pro analysi	Merck, Darmstadt, Tyskland
Ortofosforsyre, 85%	Pro analysi	Rhône-Poulenc Ltd., Manchester, England
Eddiksyre, 100%	Pro analysi	Rhône-Poulenc Ltd., Manchester, England
Natriumhydroksid	Pro analysi	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dinatriumfosfat med tolv krystallvann	Pro analysi	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumfosfat med ett krystallvann	Pro analysi	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumacetat med tre krystallvann	Pro analysi	Merck, Darmstadt, Tyskland
Vann	Renset med EASYpure™	

Tabell 2-3: Utstyr anvendt i arbeidet (tabell fortsetter neste side).

Utstyr	Typebetegnelse	Produsent
CE-instrument	P/ACE™ System MDQ med UV- og PDA-detektor	Beckman, Fullerton, CA, USA
Kapillær	Fused silica tubing, 75 µm I.D., 375 µm O.D.	BGB Analytik AG, Anwil, Sveits
Kapillærbrenner	CE capillary Burner EK 1.2	Elektro-Kinetic Techn., Broxburn, England
CE-prøvebeholder	0,2 ml	Advanced Biotechn.Ltd., Surrey, England
Vekt	AE 200	Mettler, Sveits
Ultralydbad	Branson 2200	Branson, CT, USA
Vibrator	Vibramax 100	Heidolph, Kelheim, Tyskland
Vortexmikser	Vibrofix VF1 electronic	Janke & Kunkel, GMBH & CO. KG, Staufen, Tyskland
Vannrenseanlegg	EASYpure™ UV	Barnstead, Dubuque, IA, USA
pH-meter	E 632 Digital PH-meter	Metrohm Ltd., Sveits
pH-papir	pH 3,5-6,8 pH 5,0-8,0 pH 7,0-10,0	J. T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
pH-papir	Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt, Tyskland
Automatpipetter	Finnpipetter	Labsystems, Helsingfors, Finland
Pipettespisser	Finntip®	Labsystems, Helsingfors, Finland
Sprøyte	Microliter® 50 µm	Hamilton-Donaduz, Sveits
Sprøyter	10 ml	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Filter	0,45 µm	Minisart RC 25, Sartorius AG, Göttingen, Tyskland
Prøveglass	2 ml, 2-DV	Chromacol Ltd., Trumbull, CT, USA
Brønn	Micro-insert	VWR International, West Chester, PA, USA
Brønn	Micro-vi 03-NV	Chromacol Ltd., Trumbull, CT, USA

Korker med silikon-septum	11-DSC (R)-ST14×147/205	Chromacol Ltd., Trumbull, CT, USA
Kanyler	0,8 × 40 mm 0,8 × 50 mm	Terumo, Tokyo, Japan
Ekstraksjonsfiber	Q 3/2 Accurel KM Polypropylen hulfiber I.D. 600 µm, veggykkelse 200 µm, porestørrelse 0,2 µm og polypropylen hulfiber I.D. 1200 µm, veggykkelse 200 µm, porestørrelse 0,2 µm	Membrana, Wuppertal, Tyskland Varian, Lake Forest, CA, USA
Plastrør	Conical centrifuge tubes, 15 ml	Tyco Healthcare/Kendall, Mansfield, MA, USA
Ependorfrør	Plastibrand microsentrifuge tubes 1,5ml	Brand GMBH + CO, Wertheim, Tyskland
Ependorfrør	104.623-500, 2 ml	Struers KEBO Lab, Albertslund, Danmark
Lim	Super plastix 2 g / 4 ml	Loctite, Gøteborg, Sverige
Heparinrør	Venoject, lithium heparin, 10 ml	Terumo, Tokyo, Japan
Kanyler	Venoject 0,8 × 40 mm	Terumo, Tokyo, Japan
Sentrifuge	Hettich universal 32 R	A. Hettich, Tuttlingen, Tyskland

CE-instrumentet var koblet til Compaq Deskpro[®] installert med System MDQ software versjon 1,5.

2.2 Løsninger og buffere

Stamløsninger

Stamløsningene ble laget fra renstoff av amfetamin sulfat, fenylpropanolamin hydroklorid, metaraminol bitartrat, morfin hydroklorid, sotalol hydroklorid, cimetidin, atenolol og practolol. Stamløsningene ble laget i metanol 1 mg/ml. En stamløsning av metaraminol, cimetidin og atenolol 1 mg/ml i metanol ble benyttet til matriksstudiene. Til valideringen ble det benyttet en stamløsning av metaraminol 4 mg/ml i metanol og en stamløsning av intern standard etilefrin hydroklorid 0,5 mg/ml i metanol. Stamløsning av kreatinin hydroklorid ble laget i vann 100 mg/ml.

Løsningene ble lagret ved 5°C beskyttet mot lys.

Standardløsninger

Standardløsningene ble laget ved å fortynne legemidlene fra stamløsningene i samme løsemiddel som akseptorfasen benyttet i LPME-systemet. Stamløsningene ble fortynnet med 50 mM saltsyre til 10 µg/ml.

Prøveløsninger

Vandige prøveløsninger av legemidlene ble laget ved å fortynne stamløsningene med vann til 10 µg/ml. Plasma og urinprøver tilsatt legemidler til konsentrasjonen 10 µg/ml ble laget fra 100 µg/ml hjelpeløsninger. Hjelpeløsningene var fortynninger i vann av stamløsningene på 1 mg/ml. Prøveløsningene til valideringen ble laget ved å benytte vandige hjelpeløsninger som var fortynninger av stamløsningene av metaraminol 4 mg/ml og etilefrin hydroklorid 0,5 mg/ml.

Buffere benyttet i donorløsningen

Fosfatbuffer pH = 2,75 ble laget ved å løse 0,70 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne løsningen til 100 ml. pH ble justert til 2,75 med 85% orto-fosforsyre.

Det ble benyttet bufferbok ved tillaging av følgende bufferløsninger [23]:

25 mM fosfatbuffer pH = 7,0 ble laget ved å blande 39,0 ml 50 mM NaH_2PO_4 og 61,0 ml 50 mM Na_2HPO_4 og fortynne til 200 ml med vann. Fosfatløsningene ble laget ved å løse 0,70 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml og ved å løse 1,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml.

100 mM fosfatbuffer pH = 7,0 ble laget ved å blande 39,0 ml 200 mM NaH_2PO_4 og 61,0 ml 200 mM Na_2HPO_4 og fortynne til 200 ml med vann. Fosfatløsningene ble laget ved å løse 2,78 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml og ved å løse 7,16 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml.

25 mM fosfatbuffer pH = 8,0 ble laget ved å blande 5,3 ml 50 mM NaH_2PO_4 og 94,7 ml 50 mM Na_2HPO_4 og fortynne til 200 ml med vann. Fosfatløsningene ble laget ved å løse 0,70 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml og ved å løse 1,79 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml.

50 mM fosfatbuffer pH = 8,0 ble laget ved å blande 5,3 ml 100 mM NaH_2PO_4 og 94,7 ml 100 mM Na_2HPO_4 og fortynne til 200 ml med vann. Fosfatløsningene ble laget ved å løse 1,39 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml og ved å løse 3,58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml.

50 mM acetatbuffer pH = 4,6 ble laget ved å blande 25,5 ml 100 mM CH_3COOH og 24,5 ml 100 mM NaCH_3COO og fortynne til 100 ml med vann. Eddiksyreløsningen ble laget ved å fortynne 0,6 ml konsentrert CH_3COOH til 100 ml med vann. Acetatløsningen ble laget ved å løse 1,36 g $\text{NaCH}_3\text{COO} \times 3 \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne til 100 ml.

Bufferløsningene benyttet i donorfase ble tilsatt ionpardanner. Løsningene ble laget ved å fortynne natriumsaltet av ionpardanneren i de forskjellige bufferløsningene, tabell 2-4.

Tabell 2-4: Buffer tilsatt ionpardanner.

Løsning	Mengde ionpardanner (mg)	Fortynnet med buffer til (ml)
50 mM natriumoktanat i 25 mM fosfatbuffer pH = 7,0	831	100
50 mM natriumoktanat i 100 mM fosfatbuffer pH = 7,0	83	10
50 mM natriumoktanat i 25 mM fosfatbuffer pH = 8,0	83	10
50 mM natriumoktanat i 50 mM fosfatbuffer pH = 8,0	83	10
75 mM natriumoktanat i 25 mM fosfatbuffer pH = 7,0	125	10
75 mM natriumoktanat i 100 mM fosfatbuffer pH = 7,0	125	10
50 mM natriumoktansulfonat i 25 mM fosfatbuffer pH = 7,0	108	10
50 mM natriumoktansulfonat i 50 mM acetatbuffer pH = 4,6	108	10
50 mM natriumoktansulfonat i fosfatbuffer pH = 2,75	108	10

Akseptorfase

100 mM saltsyre ble laget ved å fortynne 8 ml 37% saltsyre til 1000 ml med vann.

50 mM saltsyre ble laget ved å fortynne 50 ml 100 mM saltsyre til 100 ml med vann.

100 mM NaOH

100 mM NaOH ble laget ved å løse 2,00 g NaOH i 500 ml vann.

Separasjonsbuffer

Fosfatbuffer pH = 2,75 ble laget ved å løse 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i vann og fortynne løsningen til 1000 ml. pH ble justert til 2,75 med 85% orto-fosforsyre.

2.3 Biologiske prøver

Blod- og urinprøver ble samlet inn fra frivillige studenter og ansatte ved Universitetet i Oslo (UiO). Kontrollplasma ble kjøpt fra blodbanken ved Ullevål Universitetssykehus.

Urin

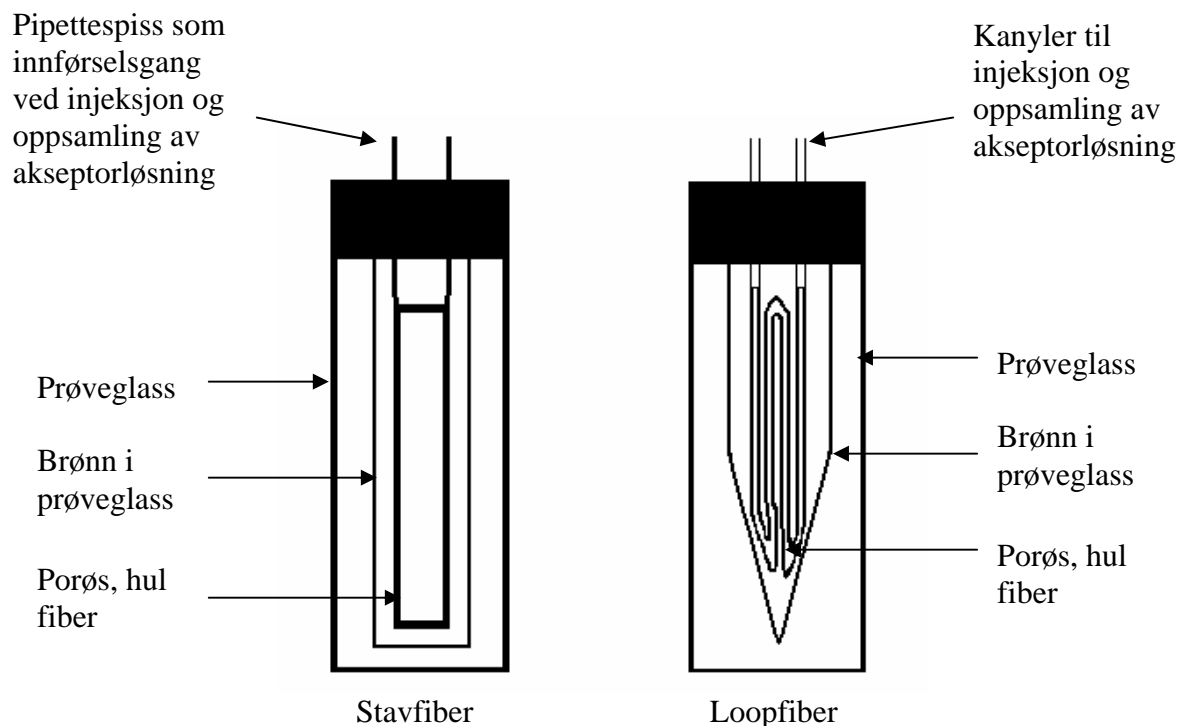
Urinprøvene ble fryst ned til -32°C etter innsamling. Prøvene ble tint på analysedagen.

Plasma

Plasma benyttet som kontrollplasma ble kjøpt inn fra blodbanken ved Ullevål Universitetssykehus. Da plasma ankom Farmasøytisk Institutt UiO ble den fordelt i 10 ml plastrør og fryst ned til -32°C . Blodprøvene fra åtte ulike individ ble tappet ved Avdeling for farmakologi ved Farmasøytisk Institutt, UiO. Prøvene ble tappet på heparinrør og sentrifugert ved 3100 rpm, 21°C i 10 minutter. Plasma ble sugd av og fryst ned til -32°C . Alle prøvene ble tint på analysedagen.

2.4 Prøveopparbeidelse

Ekstraksjonsenheten



Figur 2-1: Ekstraksjonsenhetene for stavfiber og loopfiber.

Ekstraksjonsenheten for loopfiberen besto av et 2 ml prøveglass med en skrukork med silikonseptum, figur 2-1. I prøveglasset ble det plassert en brønn på grunn av prøvevolumets størrelse. Brønnen rommet 300 μl . To kanyler med ytre diameter 0,8 mm ble ført gjennom silikonseptumet. Endene av kanylene ble forbundet med en 6,8 cm lang porøs, hul polypropylenfiber. Fiberens indre diameter var 600 μm , veggtykkelsen 200 μm og porestørrelsen 0,2 μm . Ekstraksjonsenheten med stavfiberen besto av et 2 ml prøveglass med skrukork med silikonseptum, figur 2-1. En rektanglet brønn ble plassert i prøveglasset på grunn av prøvevolumets størrelse. Brønnen rommet 300 μl . Septumet i korken ble perforert av en pipettespiss. Pipettespissen skulle støtte fiberen under ekstraksjonen og benyttes som innførselsgang for mikrolitersprøyten til injisering og oppsamling av akseptorløsning før og etter ekstraksjon. En 1,9 cm lang porøs, hul polypropylenfiber ble tredd på pipettespissen. Fiberens indre diameter var 1200 μm , veggtykkelsen 200 μm og porestørrelsen 0,2 μm . Enden av fiberen ble lukket ved å bruke tang og limt sammen med cyanoakrylat lim. Fiberen

ble også limt fast til pipettespissen. Pipettespissen ble klipt i passende lengde for at mikrolitersprøyten skulle nå bunnen av fiberen ved injisering og oppsamling av akseptorfase.

Ekstraksjonsbetingelser

Prøveløsning og bufferløsning tilsatt ionpardanner ble fylt i et ependorfrør i forholdet 1:1. Løsningen ble blandet i 5 sekunder på vortexmikser. 100 µl av blandingen ble tilsatt hver ekstraksjonsenhet. Ekstraksjonsfiberen ble dyppet i organisk løsemiddel i 5 sekunder, deretter i ultralydbad i 15 sekunder for å fjerne overskudd av løsemiddel fra fiberen. 20 µl akseptorløsning ble injisert i loopfiberen ved å benytte en mikrolitersprøyte. 15 µl akseptorløsning ble injisert i stavfiberen. Fiberen ble plassert i brønnen i prøveglasset og prøvene ble satt til ekstraksjon i 45 minutter på vibrator ved 1500 rpm. Etter fullført ekstraksjon ble akseptorfase overført til en 200 µl prøvebeholder til bruk i CE-apparatet. Fjerningen av akseptorfase fra loopfiberen ble gjort ved å legge lufttrykk på kanylen brukt ved introduksjon av akseptorfase, mens den andre kanylen ble brukt som utførselsgang for akseptorløsningen. Akseptorfase ble samlet opp fra stavfiberen ved å benytte mikrolitersprøyten. Mikrolitersprøyten ble spylt tre ganger mellom hver oppsamling med samme vandige løsning som akseptorfase opprinnelig besto av.

2.5 Kapillærelektroforese

Analyse av ekstraktene ble utført med CE. CE-betingelsene er oppgitt i tabell 2-5.

Tabell 2-5: CE-betingelser.

	Instrumentering
Kapillær	Ubehandlet kvartskapillær (fused-silika) 0,075 mm I.D. Total lengde 60 cm (effektiv lengde 50 cm)
Temperatur separasjon	25°C
prøvelagring	5°C
Injeksjon	Hydrodynamisk injeksjon med trykk, 0,5 psi i 10 sekunder
Separasjon	30 kV, 15 minutter, normal polaritet
Deteksjon	UV, 200 nm
Separasjonsbuffer	Fosfatbuffer pH = 2,75

Kapillæret ble kondisjonert daglig og ved bytte til nytt kapillær. To ulike kondisjoneringsprosedyrer ble benyttet, tabell 2-6.

Tabell 2-6: Kondisjonering av kapillær.

	Kondisjonering
Ved nytt kapillær	Spyling med vann i 5 minutter, trykk 20 psi Spyling med 100 mM NaOH i 30 min, trykk 20 psi Spyling med separasjonsbuffer i 30 min, trykk 20 psi
Daglig	Spyling med vann i 5 minutter, trykk 20 psi Spyling med 100 mM NaOH i 10 min, trykk 20 psi Spyling med separasjonsbuffer i 30 min, trykk 20 psi

Mellom hver analyse av vandige- og urinprøver ble kapillæret spylt med separasjonsbuffer i 2 minutter. Ved analyse av plasmaprøver ble kapillæret spylt med 100 mM NaOH i 2 minutter og deretter med separasjonsbuffer i 2 minutter.

Etter endt analyseserie ble kapillæret spylt med vann i 5 minutter og blåst luft igjennom i 2 minutter. Dette ble gjort for å unngå at separasjonsbufferen skulle endre kapillærveggenes egenskaper eller tette kapillæret ved lagring.

2.6 Validering

Ionparmediert LPME ble validert med hensyn på linearitet, nøyaktighet, intra-dag presisjon og reproduserbarhet ved analyse av urin- og plasmaprøver. Alle valideringsanalyser ble utført med plasma og urinprøver tilsatt metaraminol og etilefrin hydroklorid som intern standard. Ved beregning av linearitet, nøyaktighet, intra-dag presisjon og reproduserbarhet ble topparealforholdet mellom metaraminol og intern standard benyttet. Topparealene var på forhånd dividert med migrasjonstid for å korrigere for analyttenes ulike migrasjonshastighet.

Linearitet

Lineær regresjonsanalyse av metaraminol i urin- og plasmaprøver ble gjennomført. Urinen benyttet til validering med hensyn på linearitet var blandingsurin. Blandingsurinen ble tillaget ved å blande morgen-, ettermiddag- og kveldsurin fra tre ulike individ. Linearitet ble validert i konsentrasjonsområdet 0,8 til 40,0 µg/ml. Konsentrasjonsområdets nedre grense ble valgt ut fra kvantifiseringsgrensen ($S/N = 10/1$). Plasma som ble benyttet til regresjonsanalysen, var kontrollplasma fra blodbanken ved Ullevål Universitetssykehus. Plasma ble validert med hensyn på linearitet i konsentrasjonsområdet 0,4 til 40,0 µg/ml. Standardkurvene ble laget ut fra fem konsentrasjonsnivåer. Konsentrasjonsnivåene i urin var 0,8, 4,0 og 40,0 µg/ml med seks paralleller for hvert nivå og 1,0 og 10,0 µg/ml med tre paralleller for hvert nivå. Konsentrasjonsnivåene i plasma var 0,4, 4,0 og 40,0 µg/ml med seks paralleller for hvert nivå og 1,0 og 10,0 µg/ml med tre paralleller for hvert nivå. 5,0 µg/ml etilefrin hydroklorid ble benyttet som intern standard for hvert konsentrasjonsnivå. Korrelasjonskoeffisienten ble beregnet for hver standardkurve.

Nøyaktighet

Nøyaktighet ble testet ved at urin og plasma fra tre ulike individ ble tilsatt metaraminol til konsentrasjonene 2,0, 10,0 og 20,0 µg/ml. Alle prøvene ble tilsatt intern standard, etilefrin

hydroklorid, til en konsentrasjon på 5,0 µg/ml. Det ble ekstrahert seks paralleller for hvert konsentrasjonsnivå. Konsentrasjonen av metaraminol i prøvene ble beregnet ut fra arealforholdet mellom metaraminol og intern standard relatert til standardkurve som ble satt opp analysedagen. Nøyaktighet ble beregnet som prosent avvik fra sann verdi etter formelen:

$$\% \text{ avvik} = \frac{(\text{målt verdi} - \text{sann verdi}) \times 100\%}{\text{sann verdi}}$$

Intra-dag presisjon

Intra-dag presisjon ble undersøkt i urin- og plasmaprøver ved konsentrasjonsnivåene 2,0, 10,0 og 20,0 µg/ml metaraminol. Konsentrasjonsnivåene var lav, middels og høy i forhold til konsentrasjonsområdet valgt for validering med hensyn på linearitet. Alle prøvene inneholdt 5,0 µg/ml intern standard. Ekstraksjonen ble gjennomført med seks paralleller for hvert konsentrasjonsnivå. Relativt standardavvik ble beregnet for hvert nivå.

Reproduserbarhet

Reproduserbarhet ble undersøkt ved tre konsentrasjonsnivåer i urin og plasma fra tre ulike individ i løpet av tre dager. Konsentrasjonsnivåene var 2,0, 10,0 og 20,0 µg/ml. Prøvene inneholdt 5,0 µg/ml intern standard. Ekstraksjonen ble gjennomført med seks paralleller for hvert konsentrasjonsnivå av de ulike prøvene. Relativt standardavvik for de tre ulike prøvene ble beregnet for hvert konsentrasjonsnivå.

2.7 Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor

Utbyttene ble beregnet fra følgende formel:

$$\text{Utbytte} = (\text{stoffmengde i akseptorfase ved endt ekstraksjon} / \text{stoffmengde i prøven ved start}) \times 100\%$$

$$= (V_{\text{akseptor}} / V_{\text{prøve}}) \times (C_{\text{a, endelig}} / C_{\text{p, initiell}}) \times 100\%$$

V_{akseptor} er volum av akseptorfase, og $V_{\text{prøve}}$ er volum av ufortynnet prøve. $C_{\text{a, endelig}}$ er sluttkonsentrasjonen av analytt i akseptorfase ved endt ekstraksjon, og $C_{\text{p, initiell}}$ er opprinnelig konsentrasjon av analytt i prøven.

Oppkonsentreringsfaktoren (EF) defineres som forhold mellom endelig legemiddelkonsentrasjon i akseptorfase $C_{\text{a, endelig}}$ og initiell konsentrasjon av legemiddel i prøven $C_{\text{p, initiell}}$

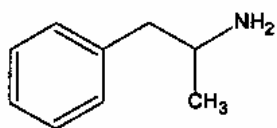
$$EF = C_{\text{a, endelig}} / C_{\text{p, initiell}}$$

$C_{\text{a, endelig}}$ ble beregnet ved bruk av toppareal korrigeret for migrasjonstid (normalisert toppareal) og kalibrert med standardløsningen av de aktuelle legemidlene.

3 Resultat og diskusjon

3.1 Karakterisering av analyserte legemidler

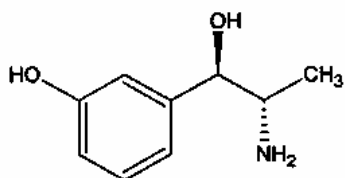
Hydrofile, basiske legemidler med log P-verdier fra 0,07 til 1,14 ble valgt som modellsubstanser, figur 3-1. Amfetamin ble inkludert som lipofil modellsubstans fordi den ekstraheres ved passiv diffusjon. Forbindelsen kunne derfor benyttes som sammenlikningssubstans mot de hydrofile forbindelsene. Ionpardanneren benyttet i arbeidet var oktansyre, figur 3-2. Valg av ionpardanner ble basert på resultater fra ett tidligere arbeid med ionparmediert LPME [11]. På grunn av modellsubstansenes basiske egenskaper kunne et hydrofobt ionparkompleks dannes med ionpardanneren ved pH 7.



Amfetamin

pKa = 9,94

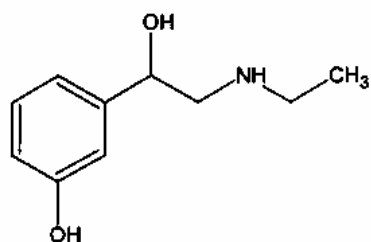
log P = 1,81



Metaraminol

pKa = 8,47

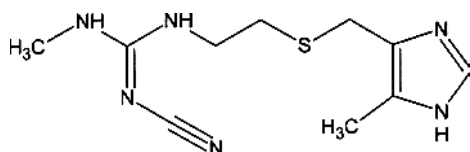
log P = 0,07



Etilefrin

pKa = 9,23

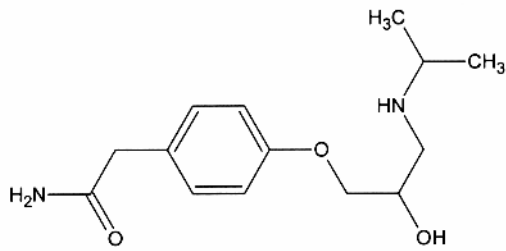
log P = 0,50



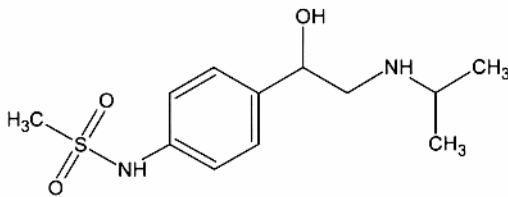
Cimetidin

pKa = 6,72

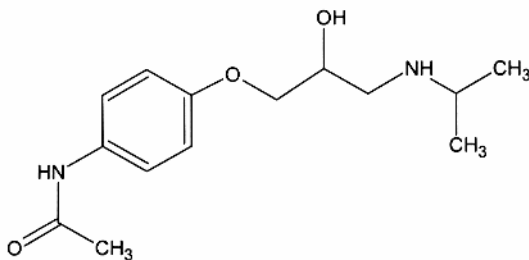
log P = 0,24



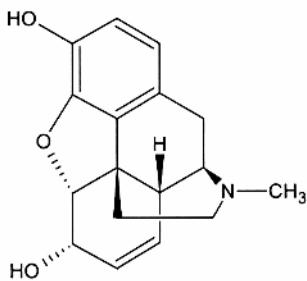
Atenolol
 $pK_a = 9,17$
 $\log P = 0,10$



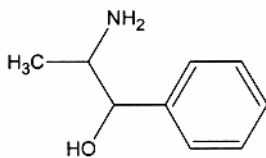
Sotalol
 $pK_a = 9,19$
 $\log P = 0,32$



Practolol
 $pK_a = 9,17$
 $\log P = 0,76$

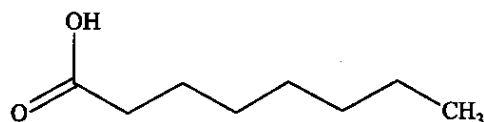


Morfin
 $pK_a = 8,14$
 $\log P = 1,14$



Fenylpropanolamin
 $pK_a = 8,47$
 $\log P = 0,81$

Figur 3-1: Modellsubstansene og intern standard (etilefrin) med $\log P$ -verdier og de aktuelle pK_a -verdiene til aminene [24].



Lop P = 2,90

pKa = 4,78

Figur 3-2: Oktansyre [24].

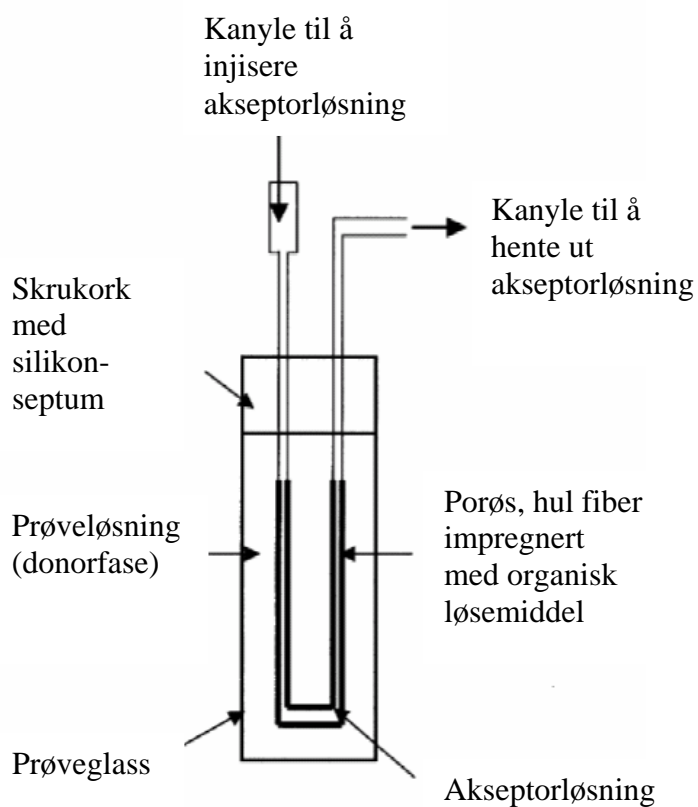
Åtte ulike legemidler ble benyttet slik at eventuelle forskjeller i ekstraksjonsutbytter kunne studeres og kobles opp mot de enkelte forbindelsenes kjemiske egenskaper. Legemidlene i blandingen lot seg separere i CE-systemet og absorberte UV-lys slik at UV-detektor kunne benyttes.

3.2 Innledende forsøk

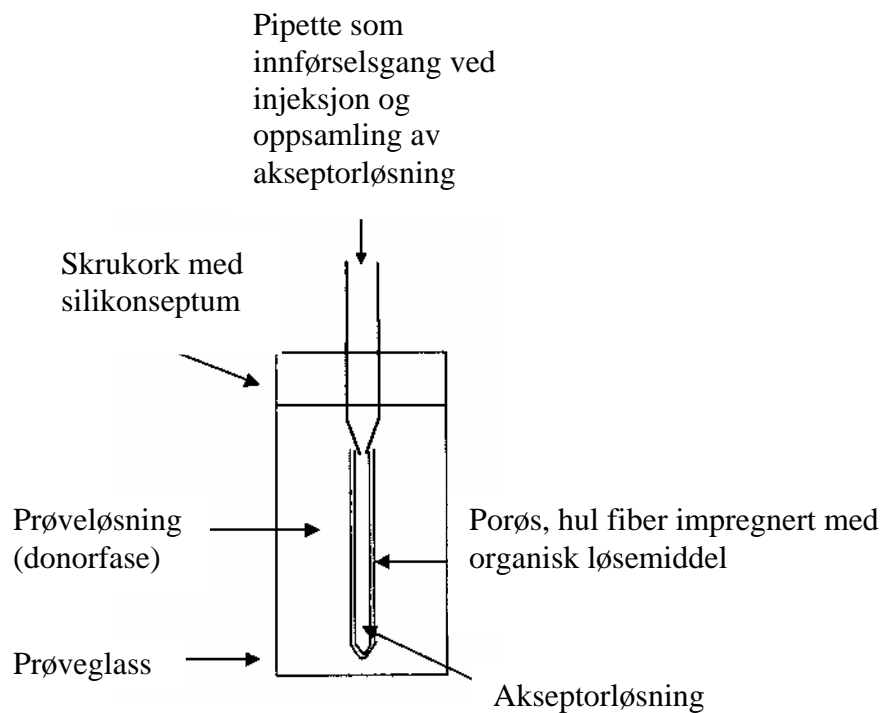
Ved ekstraksjon av hydrofile legemidler i ionparmediert LPME er det flere parametre involvert i transportprosessen sammenliknet med ekstraksjon av hydrofobe forbindelser i passiv LPME [4,10,11]. Det var derfor nødvendig å forsøke og kartlegge enkelt faktorer som kunne ha betydning for transportmekanismen før metoden ble testet i biologiske matrikser. De innledende forsøkene ble gjennomført med fortyninger av legemidlene i vann. Kjemikaliene benyttet i ekstraksjonsenheten ble valgt ut fra erfaringer gjort i et tidligere arbeid [11]. 50 mM natriumoktanat i 25 mM fosfatbuffer pH 7,0 ble blandet med prøven i forholdet 1:1. Oktanol ble benyttet som organisk fase og akseptorfase besto av 50 mM saltsyre.

3.2.1 Ekstraksjonsutbytter med stavfiber og loopfiber

I tidligere arbeid med LPME har det blitt benyttet to ulike ekstraksjonsenheter, [2,3,5,11], figur 3-3 og 3-4. Ekstraksjonsenheten med loopfiber ble benyttet i de første publikasjonene. Men fordi det var nødvendig med en enhet som kunne benyttes i en automatisert ekstraksjonsprosess, ble enheten med stavfiber utviklet.

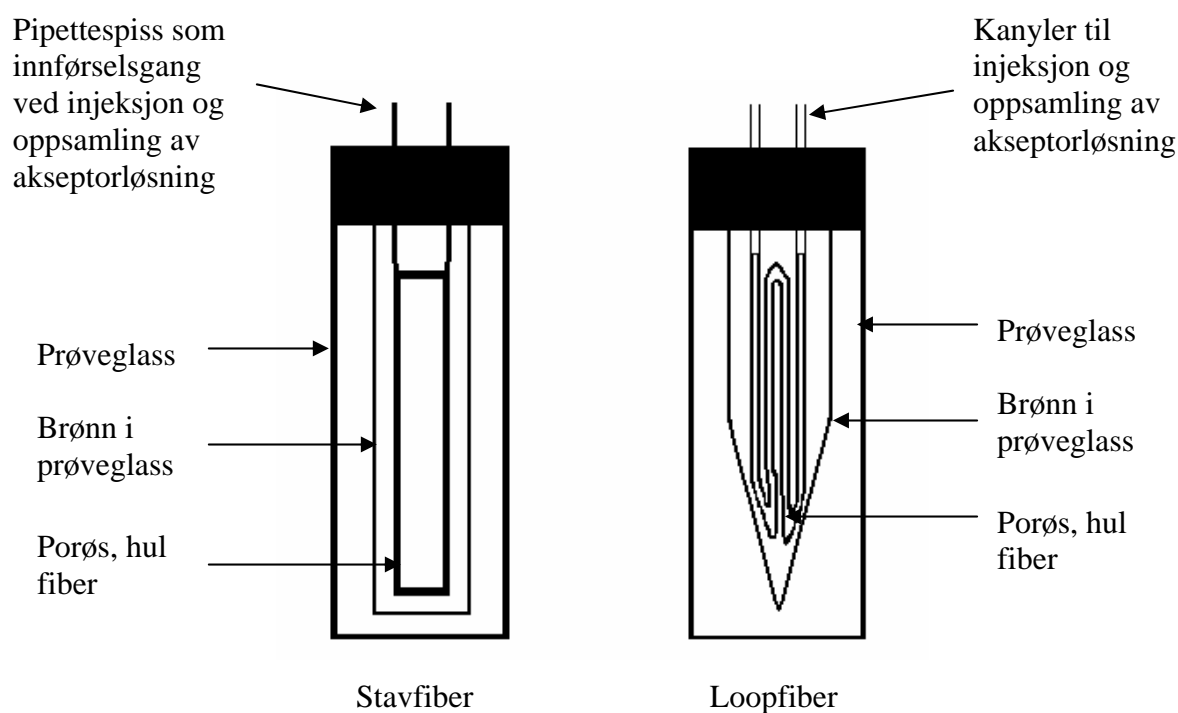


Figur 3-3: Ekstraksjonsenheten med loopfiber [5].



Figur 3-4: Ekstraksjonsenhet med stavfiber [2].

Før undersøkelser av transportmekanismen ble utført, skulle det vurderes hvilken ekstraksjonsenhet som syntes best egnet for videre arbeid med ionparmediert LPME. I dette arbeidet ble det besluttet å arbeide med små prøvevolum. En brønn ble derfor plassert i prøveglassene, figur 3-5. Dette skilte disse ekstraksjonsenhetene fra de som tidligere ble benyttet.



Figur 3-5: Ekstraksjonsenhetene for stavfiber og loopfiber.

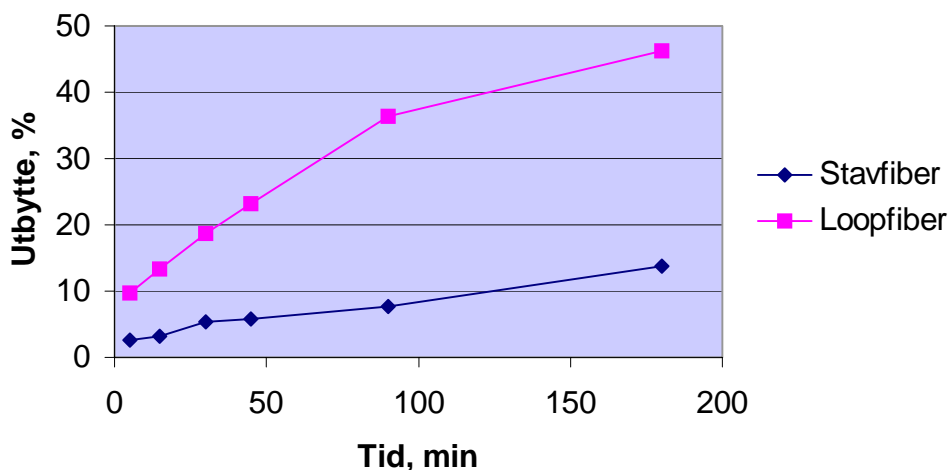
De eksperimentelle betingelsene for enhetene var noe forskjellig, tabell 3-1.

Tabell 3-1: Ulike eksperimentelle betingelser for ekstraksjonsenhetene.

	Stavfiber	Loopfiber
Fiber	I.D. 1200 μm	I.D. 600 μm
	Lengde 1,9 cm	Lengde 6,8 cm
Brønn	Avlang rettkantet, 300 μl	Spissendet, 300 μl
Akseptorfase	15 μl	20 μl

Mengde prøve, bufferløsning og konsentrasjon av ionpardanner var lik for begge enhetene.

100 µl atenolol fortynnet i vann til 10 µg/ml ble ekstrahert i de to ulike ekstraksjonsenhetene i opptil 180 minutter. Ekstraksjonsenheten med loopfiber ekstraherte legemidlet betydelig raskere enn enheten med stavfiber, figur 3-6.



Figur 3-6: Ekstraksjonsutbytter som funksjon av tiden for atenolol ved bruk av stavfiber og loopfiber (n = 5).

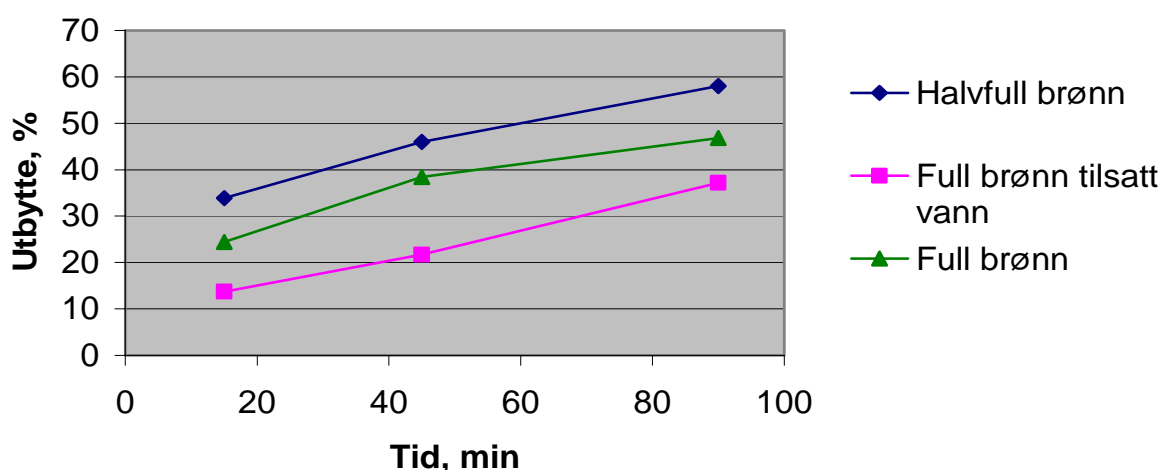
Det kan være ulike grunner til de observerte forskjellene. Loopfiberen har en større overflate enn stavfiberen. Loopfiberens overflate er ca 2,1 cm², mens stavfiberens overflate er ca 1,0 cm². Dette gir større kontaktflate mellom prøveløsningen og organisk fase i ekstraksjonsenheten for loopfiberen. Ionparkomplekset har dermed et større område tilgjengelig for diffusjon inn i organisk fase i porene av fiberen. Ekstraksjonsenhetene som ble undersøkt har ulikt format, og brønnene i prøveglassene har forskjellig utforming. En oppfatning kan være at dess kortere vei analyttene har for å komme i kontakt med fiberoverflaten, jo raskere vil ekstraksjonen skje. Dette ville være en gunstig faktor for ekstraksjon med stavfiber da fiberens store diameter og brønnens avlange smale form gir et trangt rom for donorløsningen. Men det trange rommet som dannes for donorløsningen i ekstraksjonsenheten med stavfiberen, kan føre til at kapillærkrefter holder væsken stasjonær. Det syntes derimot som ristingen skjedde mer effektivt i ekstraksjonsenheten med loopfiber. Donorløsningen i ekstraksjonsenheten med loopfiber blir lettere ristet rundt og kontakten med fiberoverflaten utveksles hyppigere. Analyttene vil trolig fordeles raskere inn i organisk fase ved slik effektiv risting av væsken. Fyllingsgraden av brønnen i prøveglasset kan påvirke hvor effektiv ristingen av væsken skjer og hvor stor del av fiberen som er dekt av prøveløsningen.

Ved nærmere undersøkelser syntes det ikke å være betydelig forskjell i fyllingsgrad av brønnene og fiberen ble dekt med prøveløsning i begge ekstraksjonsenhetene.

Ut fra resultatene presentert ble det valgt å arbeide videre med ekstraksjonsenheten for loopfiberen fordi formatet på enheten gav høyere ekstraksjonshastighet.

3.2.2 Optimalisering av donorfasevolum

Blandingen av åtte legemidler ble fortynnet til 10 µg/ml i vann. Legemidler ble ekstrahert i opptil 90 minutter med ulike donorfasevolum. Hensikten var å studere om størrelsen på donorfasevolumet ville påvirke ekstraksjonsutbyttene. En serie med brønner ble fylt med 50 µl prøveløsning og 50 µl bufferløsning tilsatt ionpardanner. En annen serie med brønner ble fylt med 50 µl prøveløsning, 50 µl bufferløsning tilsatt ionpardanner og 100 µl vann. Totalvolumene i brønnene ble henholdsvis 100 og 200 µl.



Figur 3-7: Ekstraksjonsutbytter som funksjon av tiden for sotalol med ulikt donorfasevolum (n = 3).

Figur 3-7 viser ekstraksjonshastigheten for sotalol ved forskjellig volum av donorløsningen. Halvfull brønn gav høyest ekstraksjonshastighet. Ved å unngå å fylle brønnen full ristes væsken mer effektivt. Utskifting av væskens kontakt med fiberoverflaten skjer hyppigere i en halvfull enn en full brønn. Det ble derfor besluttet å benytte kun 50 µl prøve og 50 µl bufferløsning tilsatt ionpardanner som donorløsning i det videre arbeidet.

3.2.3 Optimalisering av organisk fase

I trefase LPME basert på passiv transport er fordelingskoeffisienten av legemidlene mellom donorløsning og organisk fase og mellom organisk fase og akseptorløsning avgjørende. Valg av organisk fase er av stor betydning for å oppnå høye ekstraksjonsutbytter. Når passiv diffusjon benyttes i LPME-systemet må analyttene ha en høy fordelingskoeffisient inn i den organiske fasen. Analyttens løselighet i organisk fase må være bedre enn i vandig donorfase, men dårligere enn i vandig akseptorfase for å drive transporten [7,25]. Forbindelsenes fordelingskoeffisient mellom organisk løsemiddel og akseptorløsning er spesielt viktig for å hindre at analyttene blir fanget i organisk fase, noe som kan resultere i lave utbytter. Slik vil passiv diffusjon føre til at uønskede mer hydrofobe forbindelser forblir i organisk fase og hydrofile analytter vil diskrimineres på grunn av deres dårlige løselighet i organisk fase [5]. I ionparmediert LPME vil situasjonen være mer kompleks. Analyttene er ionisert i prøveløsningen og en ionpardanner benyttes for å fremme ekstraksjon av de hydrofile analyttene. Det må dannes et kompleks som har høyere løselighet i organisk fase enn prøveløsningen samtidig som komplekset må være stabilt. Komplekset må forbli stabilt gjennom organisk fase til kontaktflaten mellom organisk og akseptorfase. Der frigis analytten via ionebytte med motjoner i akseptorløsningen. Ionpardanneren, som i dette arbeidet er en syre, vil ha dårlig løselighet i sur akseptorfase og den vil dermed forbli i organisk fase. Protongradienten fra akseptorløsning til prøveløsningen vil drive transporten av ionpardanneren gjennom organisk fase tilbake til prøveløsningen hvor prosessen kan gjentas [11].

For at prosessen skissert ovenfor skal fungere i ionparmediert LPME, må den valgte organiske fasen være en effektiv barriere mellom vandig prøveløsning og akseptorløsning, samtidig som dens hydrofobisitet må være tilpasset ionparkompleksets kjemiske egenskaper. Det har blitt gjort ett arbeid med ionparmediert LPME. I det arbeidet ble det gjort et forsøk der det ble benytte ulike organiske faser. Resultatene viste at langkjedede alkoholer syntes å gi de høyeste utbyttene [11]. Det ble derfor valgt å undersøke tre langkjedede alkoholer for å finne den som var best egnet for blandingen på åtte legemidler, og å undersøke om det var forskjell i hva som var best egnet som organisk fase for de enkelte modellsubstansene. Legemidlene fortynnet i vann til 10 µg/ml ble ekstrahert i 45 minutter med oktanol, nonanol og dekanol som organisk fase. Heksanol og pentanol ble ikke undersøkt da disse er for vannløselige til å danne en effektiv barriere mellom to vandige løsninger [11].

Tabell 3-2: Ekstraksjonsutbytter ved bruk av ulike organiske faser

(ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

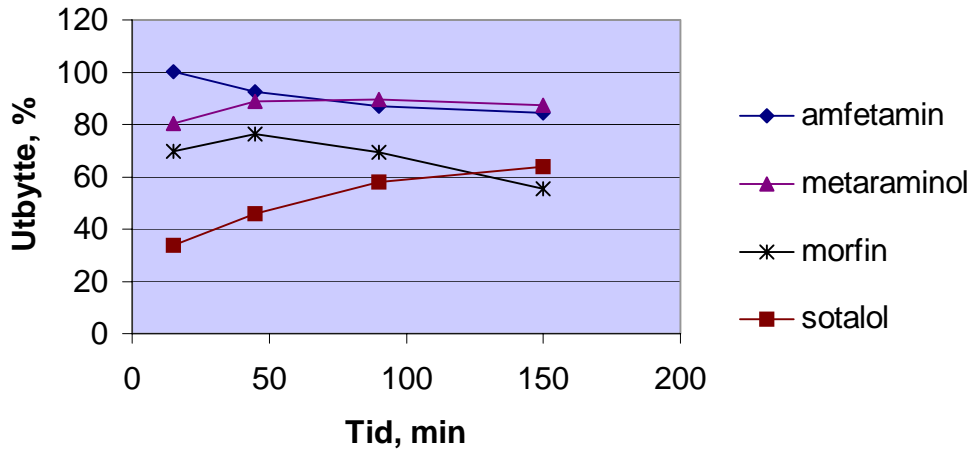
Modellsubstans	Utbytte %		
	1-oktanol	1-nonanol	1-dekanol
Amfetamin	91	77	76
Fenylpropanolamin	94	77	71
Metaraminol	88	59	43
Cimetidin	87	52	38
Morfin	83	53	41
Sotalol	62	28	16
Atenolol	34	14	7
Practolol	74	39	22

Fiber impregnert med oktanol gav høyest utbytte for alle legemidlene i blandingen, tabell 3-2. Oktanol er tilstrekkelig hydrofob slik at en effektiv barriere mellom de vandige løsningene dannes. Løsemidlet er også av en slik hydrofob karakter at fordelingen av ionparkomplekset inn i organisk fase fra prøveløsningen fremmes. Nonanol og dekanol gav lavere utbytter. De vil trolig danne en for hydrofob fase for transport av komplekset gjennom fiberveggen. Ionparkompleksets stabilitet i organisk fase er også av betydning. Dersom komplekset ikke er stabilt brytes ionparbindingen og ionene forsvinner raskt ut i donorfase etter inntreden i organisk fase. Det resulterer i lave ekstraksjonsutbytter. For å oppnå høye utbytter må metoden optimaliseres for de enkelte forbindelsene, både med hensyn på ionpardanner og organisk fase. En ionpardanner må velges slik at et stabilt kompleks dannes. Hvor stabilt ionparkomplekset er i organisk fase vil være avhengig av egenskapene til organisk fase og løseligheten av komplekset. Dipolmomentet av organisk fase må være av en slik karakter at komplekset er tilstrekkelig stabilt og løselig i fasen. Det ble besluttet å arbeide videre med oktanol som organisk fase da dette løsemidlet fungerte som en effektiv barriere mellom de vandige fasene samtidig som høye ekstraksjonsutbytter ble oppnådd.

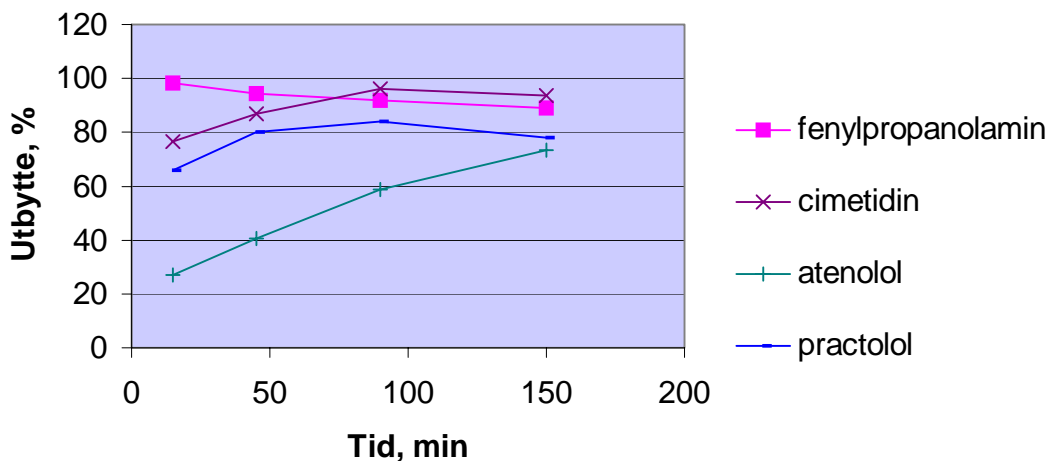
3.2.4 Tid/utbytte kurver

Ekstraksjonsutbyttene som oppnås i LPME er blant annet avhengig av ekstraksjonstiden. Utbyttene blir høyere ved lengre ekstraksjonstider. Men forskjellige forbindelser har ulik

ekstraksjonshastighet avhengig av deres kjemiske struktur og egenskaper. Det ble derfor bestemt å studere ekstraksjonshastigheten for de åtte utvalgte forbindelsene over tid, og om eventuelle maksimale utbytter ble nådd. Blandingen av åtte legemidler 10 µg/ml i vann ble ekstrahert i opptil 150 minutter. Legemidlene dannet forskjellige tid/utbytte kurver, figur 3-8 og 3-9.



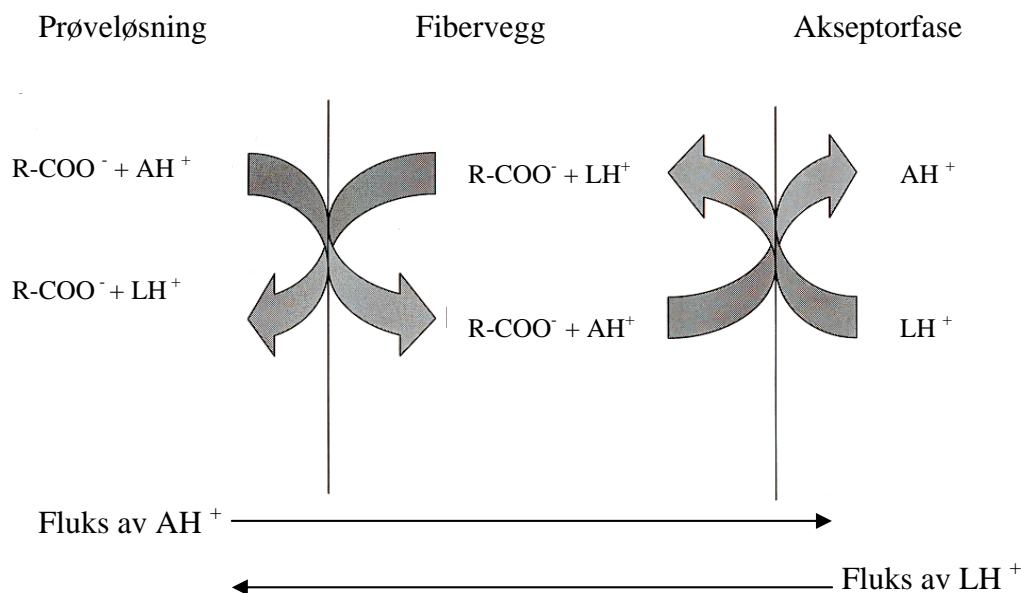
Figur 3-8: Ekstraksjonsutbytter over tid for amfetamin, metaraminol, morfin og sotalol (n = 3).



Figur 3-9: Ekstraksjonsutbytter over tid for fenylpropanolamin, cimetidin, atenolol og practolol (n = 3).

Ekstraksjonsutbyttene for de ulike legemidlene varierte over tid. Etter 90 minutter hadde ekstraksjonsutbyttene for amfetamin, metaraminol, morfin, fenylpropanolamin, cimetidin og

practolol nådd en maksimalverdi eller var begynt å synke. Ekstraksjonsutbyttene for sotalol og atenolol fortsatte å stige fram til 150 minutter. Årsaken til at ulike forbindelser har forskjellig ekstraksjonshastighet vil være knyttet til deres forskjellige affinitet til ionpardanneren og fordelingen av komplekset inn i organisk fase. At utbyttene for enkelte forbindelser begynte å synke kan tyde på kapasitetsproblemer. Normalt vil ionpardanneren frigjøre legemidlet på kontaktflaten mellom organisk fase og akseptorfase gjennom ionebytte med hydrogenioner som er tilstedet i akseptorløsningen. Ved oppkonsentrering av legemidler i akseptorfase synes det som protongradienten over fiberen svekkes. Når enkelte legemidler oppkonsentreres i akseptorfase vil ionpardanneren etter hvert benytte legemidlene som motion i tillegg til hydrogenionene. Forbindelsene som fortsatte å øke i utbytte blir ekstrahert over i akseptorfase, mens ionpardanneren danner et nytt ionparkompleks med et annet legemiddelmolekyl i akseptorløsningen, figur 3-10. Komplekset diffunderer gjennom fiberveggen over til prøveløsningen. Et legemiddelmolekyl frigjøres i prøveløsningen, mens ett nytt bindes til ionpardanneren.



A = analytt

L = legemiddel som tilbakeekstraheres

R-COOH = karboksylsyre

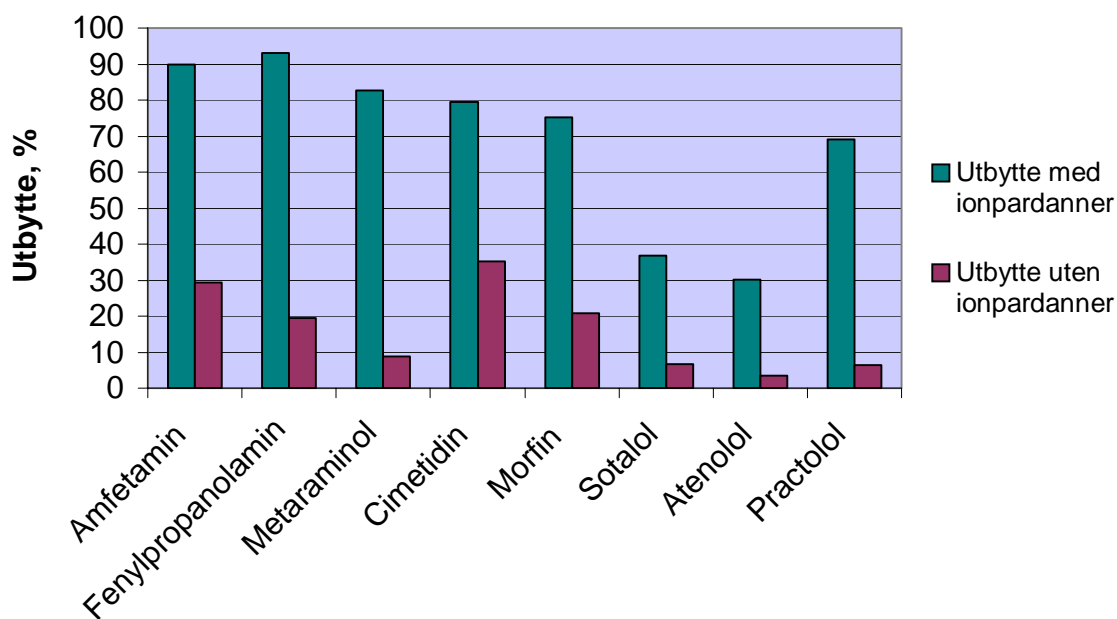
Figur 3-10: Tilbakeekstraksjon av legemidler fra akseptorfase.

En viss grad av tilbakeekstraksjon vil skje for alle forbindelsene. Men når ekstraksjonstiden øker vil tilbakeekstraksjonen etter hvert bli dominerende for de forbindelsene som

oppkonsentreres raskt i akseptorfase. De forbindelsene som ekstraheres raskt, vil trolig ha sterk affinitet for ionpardanneren. Når proton konsentrasjonen synker i akseptorløsningen, vil disse forbindelsene lettere utkonkurrere protonene som motioner. I det videre arbeidet ble 45 minutter valgt som ekstraksjonstid. Ved ekstraksjonstider lengre enn 45 minutter begynte ekstraksjonsutbyttene for flere av forbindelsene å synke, mens for andre fortsatte de å øke. Da flere forbindelser nådde høye utbytter raskt syntes det ikke nødvendig å benytte lengre ekstraksjonstid til studie og evaluering av transportmekanismen.

3.2.5 Ekstraksjonsutbytter og oppkonsentreringsfaktorer for modellsubstansene

Vann tilsatt blandingen av åtte legemidler til konsentrasjonen 10 µg/ml ble ekstrahert med og uten natriumoktanat som ionpardanner ved pH 7 for å undersøke om det er sammenheng mellom legemidlenes kjemiske egenskaper og forskjell i ekstraksjonsutbytter.



Figur 3-11: Forskjell i ekstraksjonsutbytter med og uten ionpardanner ved pH 7 (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

Forsøket viste at ekstraksjonsutbyttene for legemidlene ved pH 7 økte betraktelig ved bruk av ionpardanner, figur 3-11. Amfetamin gav et av de høyeste utbyttene uten tilsetning av ionpardanner. Selv om forbindelsen er ionisert, er trolig dens hydrofobe natur betydningsfull for det høye ekstraksjonsutbyttet. Cimetidin skilte seg ut fra de andre hydrofile legemidlene.

Legemidlet har en lav log P-verdi men gav allikevel høyest utbytte ved ekstraksjon uten ionpardanner. Dette kan skyldes aminets pKa-verdi. Med pKa-verdi nær 7 er molekylet kun delvis ionisert ved pH 7. Cimetidin ekstraheres derfor til en viss grad over den organiske fasen gjennom passiv diffusjon selv om legemidlet er hydrofilt. Ved tilsetning av ionpardanneren økte ekstraksjonsutbyttet fordi substansen da transporteres både via passiv diffusjon og ionparmediert transport.

Økningen i utbyttene var stor for de hydrofile forbindelsene ved tilsetning av ionpardanner, tabell 3-3. Ionpardanneren danner et elektronøytralt kompleks med de ioniserte hydrofile analyttene. Kompleksene som dannes har en høyere fordelingskoeffisient inn i den organiske fasen enn analyttene har alene. Det er for ioniserte hydrofile forbindelser, ionparmediert transport som dominerer fremfor passiv diffusjon.

Tabell 3-3: Log P-verdier og prosent økning i ekstraksjonsutbyttet ved tilsetning av ionpardanner ved pH 7 (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

Legemiddel	Log P	Økning i utbyttet ved bruk av ionpardanner
Amfetamin	1,81	206 %
Fenylpropanolamin	0,81	376 %
Metaraminol	0,07	839 %
Cimetidin	0,24	126 %
Morfin	1,14	259 %
Sotalol	0,32	447 %
Atenolol	0,10	788 %
Practolol	0,76	962 %

I legemiddelblandingen fantes det primære, sekundære og tertiære aminer. Forbindelsene som gav de tre høyeste utbyttene med ionpardanner, amfetamin, fenylpropanolamin og metaraminol, er primære aminer. Både amfetamin og fenylpropanolamin gav høye utbytter uten bruk av ionpardanner, og deres høye utbytter ved tilsetning av ionpardanner kan skyldes substansenes opprinnelige hydrofobisitet. Metaraminol derimot er en spesielt hydrofil forbindelse som gav stor økning i utbytte ved å benytte en ionpardanner. Det er mulig at

amingruppen på primære aminer vil være lettere tilgjengelig for binding til ionpaddanneren på grunn av mindre grad av sterisk hindring. Dette kan bidra til å gi høyere ekstraksjonsutbytter for primære aminer dersom forbindelsens stereokjemi ikke skjermer amingruppen.

Maksimal oppkonsentreringsfaktor som kunne oppnås for legemidlene i den anvendte ekstraksjonsenheten var 2,5. Alle legemidlene unntatt sotalol og atenolol ble oppkonsentrert, tabell 3-4.

Tabell 3-4: Oppkonsentreringsfaktorer for åtte legemidler
(ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

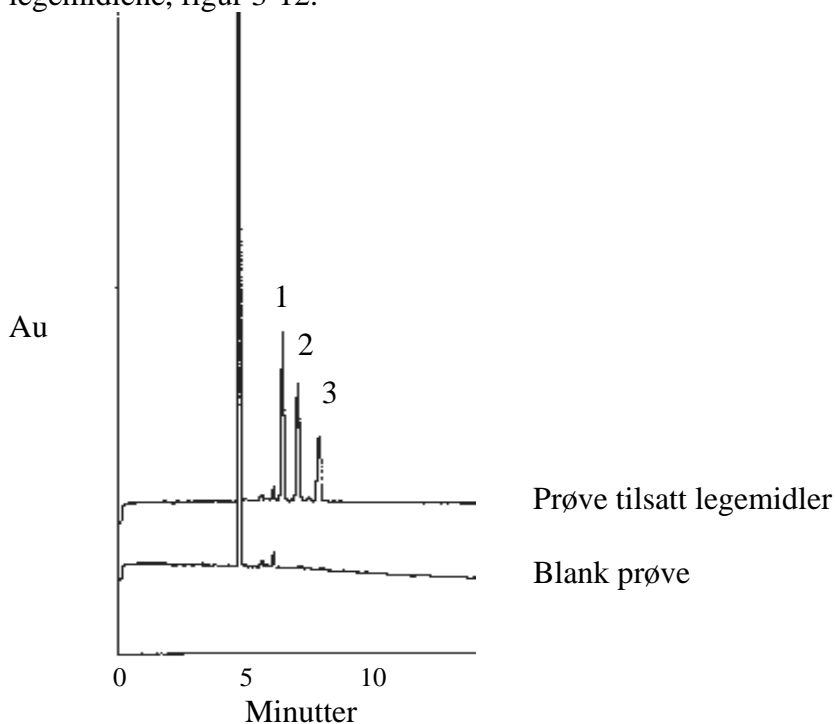
Legemiddel	Utbytte i %	Oppkonsentreringsfaktor (maks 2,5)	Log P
Amfetamin	90	2,3	1,81
Fenylpropanolamin	93	2,3	0,81
Metaraminol	83	2,1	0,07
Cimetidin	79	2,0	0,24
Morfin	75	1,9	1,14
Sotalol	37	0,9	0,32
Atenolol	30	0,8	0,10
Practolol	69	1,7	0,76

3.3 Analyse av biologiske prøver

Ionparmediert LPME er ikke validert med hensyn på biologiske prøver. Det syntes derfor nødvendig å studere mekanismen i ulike biologiske matriser for å undersøke om metoden er egnet for biologiske prøver. Plasma og urin ble valgt som matriser på grunn av deres ulike sammensetning og innhold av forskjellige matrisekomponenter som kunne påvirke ekstraksjonsprosessen. Metaraminol, cimetidin og atenolol ble benyttet i arbeidet fordi matrisekomponenter ikke interfererte med signalet de gav i elektroferogrammene og fordi dette var tre substanser som gav vesentlig forskjellige ekstraksjonsutbytter. Donorfase besto av 50 mM natriumoktanat i 25 mM fosfatbuffer pH = 7,0 som ble blandet med prøven i forholdet 1:1. Oktanol ble benyttet som organisk fase og akseptorfase besto av 50 mM saltsyre.

3.3.1 Ekstraksjon av legemidler fra urin

Ekstraksjon av legemidler fra urin gav ekstrakter som inneholdt enkelte endogene komponenter fra urin. Disse komponentene ble ekstrahert over i akseptorfase sammen med legemidlene, figur 3-12.



Figur 3-12: Ekstrakt av blank urin og urin tilsatt metaraminol¹, cimetidin² og atenolol³ 10 µg/ml (ekstraksjonstid = 45 minutter).

Ut fra forbindelsenes migrasjonsrekkefølge kan det fastslås at de endogene komponentene som ekstraheres over i akseptorløsningen er baser.

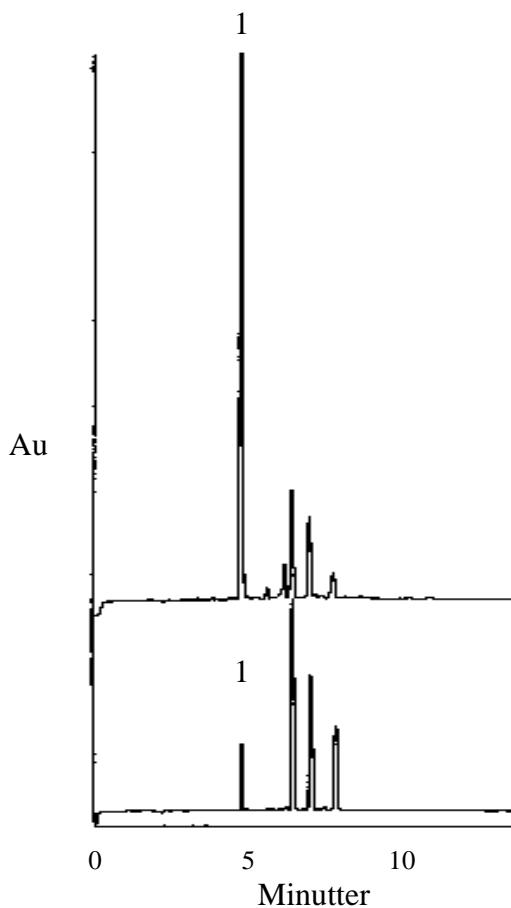
Morgen-, ettermiddags- og kveldsurin ble samlet inn fra tre ulike individ. Urinprøvene ble tilsatt metaraminol, cimetidin og atenolol til 10 µg/ml og ekstrahert med ionparmediert LPME. Ekstraksjonsutbyttene av legemidlene fra de ni ulike urinprøver varierte betydelig, tabell 3-5.

Tabell 3-5: Ekstraksjonsutbytter og relativt standardavvik for ni ulike urinprøver (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

Individ	Prøve	Utbytte i %		
		Metaraminol	Cimetidin	Atenolol
Person 1	Morgen	84	78	26
	Ettermiddag	92	85	34
	Kveld	70	67	18
Person 2	Morgen	52	56	12
	Ettermiddag	78	77	21
	Kveld	54	56	10
Person 3	Morgen	73	74	18
	Ettermiddag	63	66	13
	Kveld	90	79	31
RSD i %		19	14	39

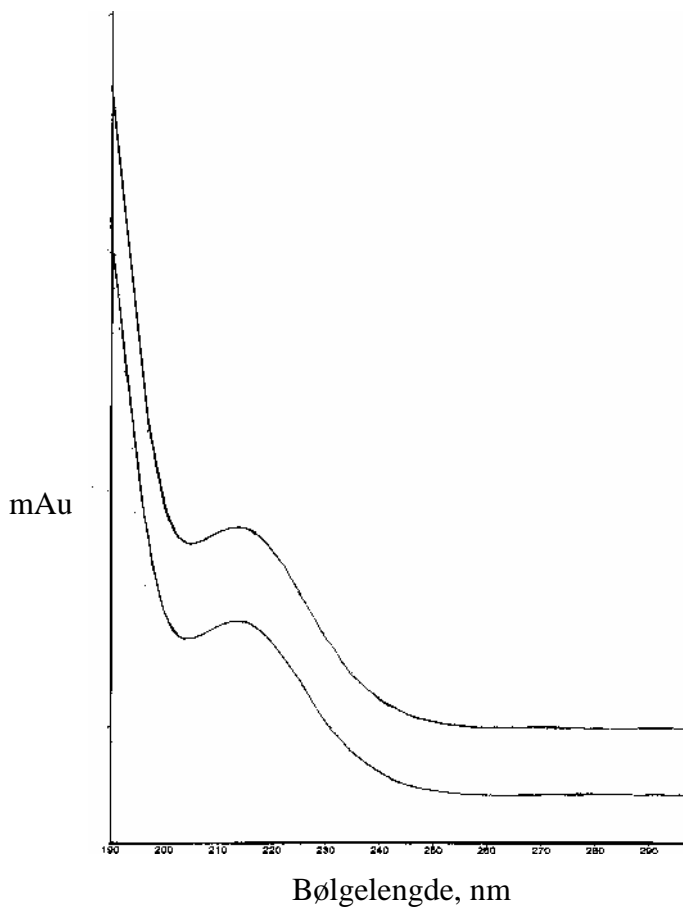
Urin er en variabel matrisks og ut fra resultatene er det tydelig at matriskskomponenter i urin har betydning for ekstraksjonsutbyttene i de forskjellige prøvene. De observerte forskjellene kunne relateres til hvor konsentrert eller fortynnet en urinprøve var. Sterkt fargede prøver det vil si konsentrerte prøver, gav generelt lavere utbytter enn fortynnede prøver. Tilstrekkelig bufring til pH 7 var nødvendig for å sikre at ionpardanneren og legemidlene i prøven var ionisert, og for at urinens opprinnelige pH ikke skulle ha innvirkning på ionpardannerens eller legemidlenes ioniseringsgrad i donorløsningen. pH i de ulike urinprøvene ble målt før og etter tilsetning av bufferløsning med ionpardanner. Urinprøvenes opprinnelige pH varierte fra ca 6 til 8. Etter tilsetning av bufferløsning med ionpardanner ble pH justert til 7 i alle prøvene.

Ved analyse av urinprøver fantes det et karakteristisk signal med samme migrasjonstid i elektroferogrammene for alle prøvene. Ut fra forbindelsens plassering i elektroferogrammet, kan det konkluderes med at forbindelsen er en base. Signalet syntes å være sterkt avhengig av om urinprøven var konsentrert eller fortynnet, figur 3-13.



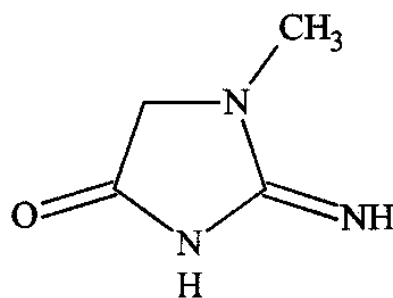
Figur 3-13: Elektroferogram med karakteristisk signal ¹ i konsentrert urinprøve(øverst) og fortynnet urinprøve (nederst).

Ved å sammenlikne migrasjonstiden og UV-spekteret for forbindelsen med tiden og spekteret for kreatinin ble komponenten identifisert som kreatinin, figur 3-14.



Figur 3-14: UV-spekter for kreatinin hydroklorid fortynnet i vann (øverst) og fortynnet urinprøve (nederst).

Kreatinin skilles ut i store mengder i urin, 25 mg per kg kroppsvekt per døgn [12]. Døgnutskillelsen er konstant og nivået av kreatinin i en urinprøve kan angi hvor konsentrert en prøve er [26]. Kreatinin er en svakt basisk og hydrofil substans, figur 3-15.



Log P = -1,69

pKa = 4,83

Figur 3-15: Kreatinin [24].

Ved pH 7 er forbindelsen i hovedsak tilstedet i uionisert form. Men fordi konsentrerte urinprøver inneholder store mengder kreatinin vil kreatinin kunne danne ionparkompleks med ionpardanneren i donorfase. Kreatinin er meget hydrofil og trolig vil forbindelsen binde opp betydelige mengder av ionpardanneren i donorfase slik at ionpardanneren blir mindre tilgjengelig for dannelsen av ionparkompleks med legemidlene i prøven. I et forsøk på å utjevne forskjellene mellom prøvene ble mengde ionpardanner tilsatt prøven økt. Ved å benytte høyere konsentrasjon av ionpardanner i donorfase, ble ikke forskjellen mellom urinprøvene redusert til ønsket nivå, tabell 3-6. Konsentrasjonen av ionpardanner ble derfor ikke endret i det videre arbeidet.

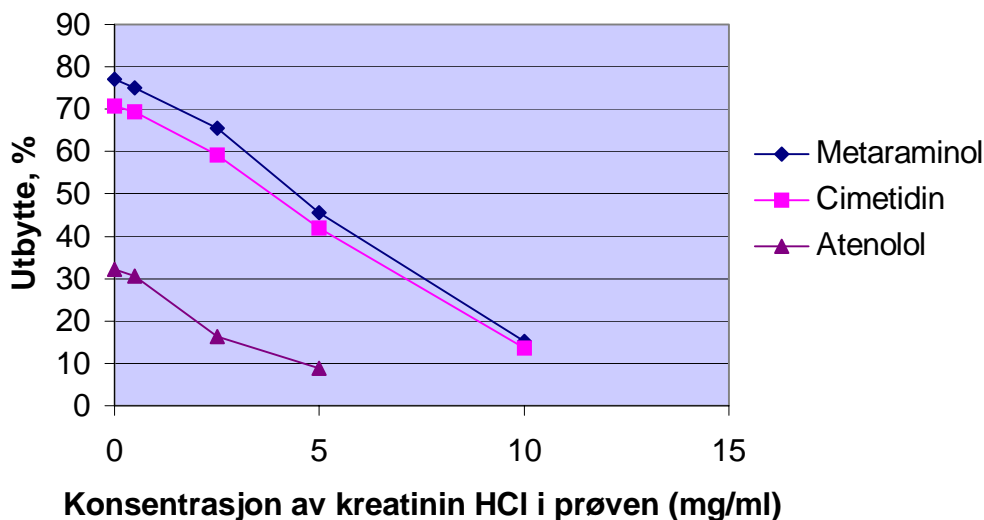
Tabell 3-6: Relativt standardavvik for utbyttene fra ni ulike urinprøver

(ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

	RSD i %	
	50 mM natriumoktanat	75 mM natriumoktanat
Metaraminol	19	21
Cimetidin	14	24
Atenolol	39	31

Ionpardanneren har dårlig løselighet i akseptorfase. Det var derfor ikke mulig å øke konsentrasjonen av ionpardanneren i donorfase ytterligere da det ble observert utfellinger i akseptorfase. Organisk fase ble trolig mettet med ionpardanneren, noe som førte til at den ble utfelt i akseptorløsningen.

For å teste om kreatinin hadde innvirkning på ekstraksjonsutbyttene ble vann med legemidlene i konsentrasjonen 10 µg/ml tilsatt ulike mengder kreatinin. Ekstraksjonsutbyttene sank ved økt tilsatt mengde kreatinin, figur 3-16. Det er tydelig at urinprøvenes innhold av kreatinin påvirker ekstraksjonsprosessen.



Figur 3-16: Ekstraksjonsutbytter ved tilsetning av varierende mengder kreatinin (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

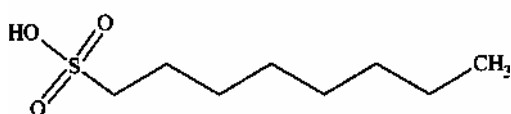
I et forsøk på å deionisere kreatinin ble pH og konsentrasjonen av buffer økt i prøveløsningen. pH i bufferløsningen ble hevet til 8,0. Dersom kreatinin ble deionisert kunne større mengder av ionpaddanneren være tilgjengelig for kompleksdannelse med legemidlene. Forskjell i ekstraksjonsutbyttene mellom tre ulike urinprøver ble noe redusert ved å øke pH i prøveløsningen, tabell 3-7. Men reduksjonen var ikke tilstrekkelig til å utviske matrikseffektene. Det videre arbeidet ble utført ved pH 7 i donorfasen.

Tabell 3-7: Relativt standardavvik for ekstraksjonsutbyttene fra morgen-, ettermiddag- og kveldurin (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

	RSD i %		
	25 mM fosfatbuffer	25 mM fosfatbuffer	50 mM fosfatbuffer
	pH = 7,0	pH = 8,0	pH = 8,0
Metaraminol	19	15	11
Cimetidin	9	3	3
Atenolol	36	31	23

Urin inneholder store mengder syrer og andre komponenter [13]. Forbindelser som skilles ut i urin er ofte hydrofile [27]. Syrer som er tilstedet i urin kan ved pH 7 fungere som ionpaddannere for de basiske legemidlene. Endogene ionpaddannere kan dersom de er hydrofile binde opp legemidlene i donorfase fordi hydrofile ionparkompleks ikke ekstraheres

over den organiske fasen. Dette kan senke utbyttene av legemidlene i prøver som er konsentrerte og inneholder store mengder hydrofile syrer. I et forsøk på å deionisere enkelte av syrene i urin ble pH senket i donorløsningen. Dersom syrene danner ionparkompleks med legemidlene kunne forskjellene i utbytte utliknes ved å deionisere syrene. Natriumoktansulfonat ble forsøkt som ionpardanner på grunn av forbindelsens lave pKa-verdi, figur 3-17. Fosfatbuffer og acetatbuffer ble benyttet som bufferløsninger for å senke pH til henholdsvis 2,75 og 4,6.



Log P = 2,82

pKa = -1,68

Figur 3-17: Oktansulfonsyre [24].

Ved å skifte ionpardanner ble ekstraksjonsutbyttene gjennomgående lavere. For morgenurin ble ikke legemidlene ekstrahert til kvantifiserbar mengde ($S/N = 10/1$). Natriumoktansulfonat med oktanol som organisk fase er derfor mindre egnet som ionpardanner for legemidlene under de gitte betingelsene. Forskjellene i utbytter ble heller ikke utjevnet ved å senke pH i prøveløsningen.

Nedsatt utbytte ved analyse av legemidler i konsentrerte urinprøver kan også skyldes prøvenes ulike ionestyrke. Videre undersøkelser må gjennomføres for å undersøke hvilken effekt økt ionestyrke i prøven har på ekstraksjonsutbyttene.

3.3.2 Valg av intern standard

Intern standard skal korrigere for tap ved prøveopparbeidelse, og blir tilsatt prøveløsningen før prøveopparbeidelsen [16]. Uten bruk av intern standard varierte utbyttet av metaraminol fra ni ulike urinprøver med 19 % (RSD). De andre legemidlene i blandingen, cimetidin og atenolol, ble forsøkt som intern standard. Ved å benytte atenolol som intern standard ble RSD høyere (21%). Med cimetidin som intern standard ble RSD redusert (6 %). I et forsøk på å redusere forskjellene i ekstraksjonsutbytte mellom prøvene ytterligere enn det som ble observert med cimetidin som intern standard, ble det valgt å undersøke om det å velge en intern standard som var svært lik analytten i struktur ville ha større effekt. Etilefrin ble valgt

som intern standard for metaraminol. RSD for parallellene til de ulike prøvene ble satt ned betydelig ved bruk av etilefrin, tabell 3-8. Forskjell i utbytte mellom de ulike prøvene ble også redusert, RSD ble endret fra 14 til 1 %.

Tabell 3-8: Ekstraksjonsutbytter for metaraminol og relativt standardavvik med og uten bruk av intern standard (ekstraksjonstid 45 minutter, n = 3).

		Utbytte i %	RSD i %	RSD ved bruk av IS i %
Person 1	Morgen	53	14	0,9
	Ettermiddag	73	9	0,8
	Kveld	68	6	0,4
Person 2	Morgen	67	8	0,5
	Ettermiddag	64	4	0,2
	Kveld	64	1	0,4
Person 3	Morgen	50	9	1,0
	Ettermiddag	81	2	0,0
	Kveld	73	3	0,4

I ionparmediert LPME er det nødvendig å velge intern standarder som har svært lik struktur som analyttene for å undertrykke teknikkens store selektivitetsforskjeller. Det vil si ekstraksjonsutbyttet og presisjon påvirkes lett av stoffegenskapene til analyttene.

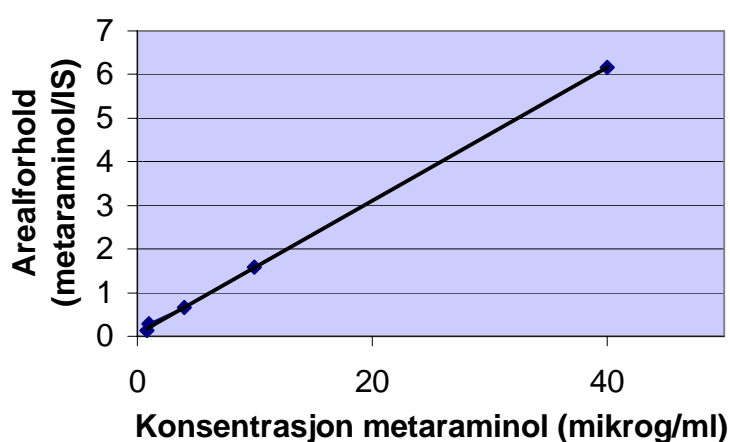
3.3.3 Validering av ionparmediert LPME av urinprøver

Matriksstudien viste at store variasjoner i utbyttene kunne forekomme ved analyse av ulike urinprøver. Variasjonene skyldtes ulikt innhold av matrikskomponenter. En metode kan allikevel være robust så lenge det benyttes en passende intern standard. Det er også avgjørende at ekstraktet ikke inneholder komponenter som gir interfererende signaler i det aktuelle kromatografiske systemet, og mengdene som analyseres befinner seg over kvantifiseringsgrensen for substansen. Ionparmediert LPME av urinprøver ble valgt å

valideres med hensyn på metaraminol med etilefrin som intern standard. Ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter.

Linearitet

Linearitet ble vurdert i området 0,8 til 40,0 $\mu\text{m/ml}$ for urin. Standardkurven viser at det er linearitet mellom konsentrasjon av legemiddel tilsatt prøven og detektert signal etter LPME og CE-analyse, figur 3-18. Korrelasjonskoeffisienten var $r = 0,9998$.



Figur 3-18: Standardkurve for metaraminol med intern standard i urin.

Nøyaktighet

Nøyaktighet ble testet for tre ulike konsentrasjoner i tre forskjellige urinprøver med ulik fortynningsgrad. Urin fra tre ulike individ ble benyttet for å utelukke at matrikssammensetningen påvirket nøyaktigheten. Nøyaktigheten varierte fra 0,2 til 10,0 % avvik fra sann konsentrasjon, tabell 3-9. De høyeste avvikene ble observert for prøver med lav konsentrasjon av legemiddel. Food and Drug Administration (FDA), USA har fastsatt bestemte krav knyttet til validering av bioanalytiske metoder. I følge deres retningslinjer skal nøyaktighetsmålinger avvike mindre enn 15 % fra sann verdi [28]. Ved analyse av urinprøver tilfredsstilte metoden dette kravet.

Tabell 3-9: Nøyaktighet for konsentrasjonsbestemmelse av metaraminol i urin (n = 6).

Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Nøyaktighet (Avvik i %)		
	Person 1	Person 2	Person 3
2,0	8,0	10,0	8,5
10,0	0,2	3,8	5,0
20,0	0,4	1,2	3,6

Intra-dag presisjon

Intra-dag presisjon ble testet for tre ulike konsentrasjonsnivåer. Presisjonen varierte fra 0,7 til 12,7 % i relativt standardavvik, tabell 3-10.

Tabell 3-10: Intra-dag presisjon for metaraminol i urin (n = 6)

Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-dag presisjon (RSD i %)
2,0	12,7
10,0	0,8
20,0	0,7

Presisjonen kan variere på grunn av manuell tillaging av ekstraksjonsenheden og små pipetteringsvolum. Presisjonen lå innenfor FDAs grense på 15 % [28].

Reproduserbarhet

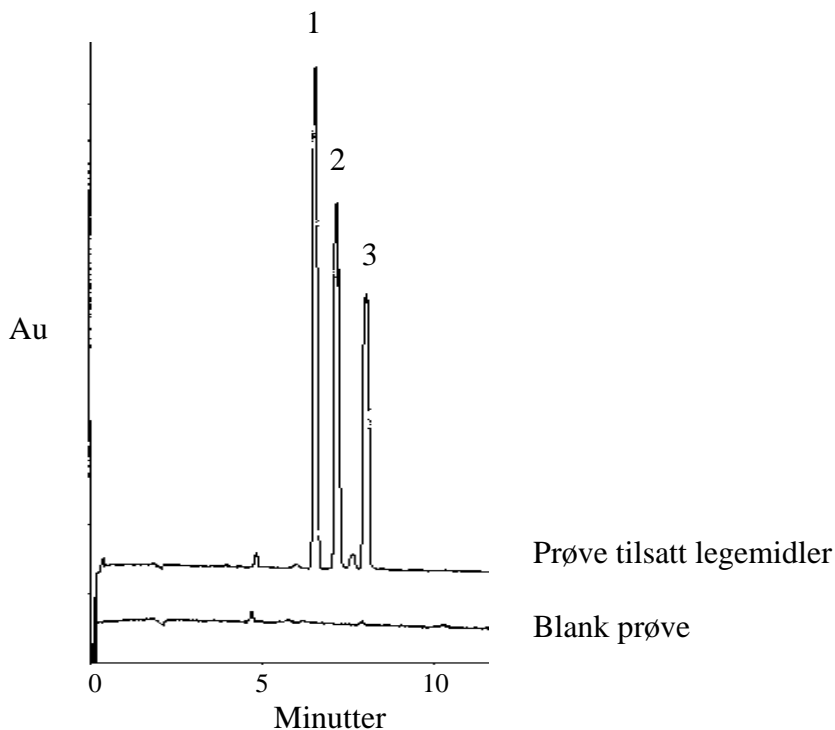
Reproduserbarheten til systemet ble testet ved å analysere urinprøver fra tre ulike individ tilsatt 2,0, 10,0 og 20,0 $\mu\text{g/ml}$ i løpet av tre forskjellige dager, tabell 3-11. Reproduserbarheten varierte fra 0,8 til 2,0 % i relativt standardavvik.

Tabell 3-11: Reproduserbarhet for metaraminol i urin (n = 6).

Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Reproduserbarhet (RSD i %)
2,0	0,8
10,0	2,0
20,0	1,3

3.3.4 Ekstraksjon av legemidler fra plasma

Plasma er den mest analyserte matriksen. Det er derfor avgjørende at metoden fungerer for analyse av legemidler i plasma. Plasma er en klebrig væske med 7-8 % proteiner [14]. Dersom mikroekstraktet inneholder store mengder proteiner, vil kapillæret i CE-instrumentet kunne tettes. Det er derfor viktig med en effektiv opprensing av plasmaprøvene. I motsetning til urin er plasma en konstant matriks og innhold av matrikskomponenter vil ikke variere i like stor grad som i urin [15]. Metoden ble allikevel testet med plasma fra åtte forskjellige individ. Ekstraksjon av plasmaprøver med og uten legemidler gav ekstrakter uten interfererende signaler i elektroferogrammet, figur 3-19.



Figur 3-19: Ekstrakt av blank plasma og plasma tilsatt metaraminol ¹, cimetidin ² og atenolol ³ 10 $\mu\text{g/ml}$ (ekstraksjonstid = 45 minutter).

Plasma fra åtte ulike individ tilsatt metaraminol, cimetidin og atenolol til 10 µg/ml ble ekstrahert. Liten variasjon i ekstraksjonsutbyttene mellom individene ble funnet, tabell 3-12.

Tabell 3-12: Ekstraksjonsutbytter og relativt standardavvik for åtte ulike plasmaprøver (ekstraksjonstid = 45 minutter, n = 3).

	Utbytter i %		
	Metaraminol	Cimetidin	Atenolol
Person 1	79	75	39
Person 2	86	81	46
Person 3	91	87	44
Person 4	93	90	41
Person 5	92	89	41
Person 6	93	87	45
Person 7	91	84	40
Person 8	99	96	44
RSD i %	6	7	6

De andre legemidlene i blandingen, cimetidin og atenolol, ble forsøkt som intern standard for metaraminol for å undersøke om de kunne redusere forskjellene i ekstraksjonsutbytte mellom prøvene. Ved å benytte atenolol som intern standard ble RSD for utbyttene fra åtte individ uforandret (7 %). Med cimetidin som intern standard ble RSD redusert (2 %). I en analyse av åtte plasmaprøver med hensyn på metaraminol ble det observert RSD for utbyttene på 9 % uten intern standard og RSD på 5 % med etilefrin som intern standard. Forsøkene viste at ved å benytte en passende intern standard vil forskjellene i ekstraksjonsutbytter mellom de ulike plasmaprøvene reduseres. Plasma inneholder ikke konkurrerende matrikskomponenter i samme grad som urin, og transportprosessen vil derfor ikke være like følsom for ulikt innhold av matrikskomponenter.

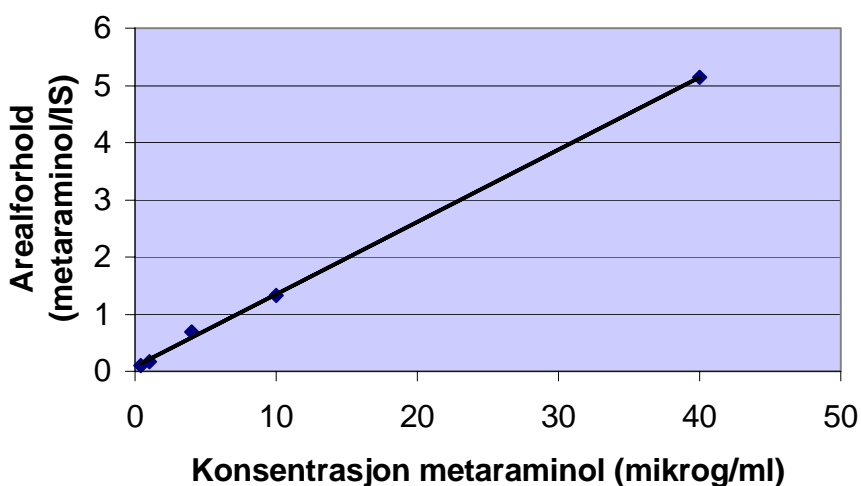
3.3.5 Validering av ionparmediert LPME av plasmaprøver

Ekstraksjon av legemidler fra plasma gav ekstrakter uten interfererende signaler i elektroferogrammet og ingen betydelige forskjeller ble observert ved ekstraksjon av åtte forskjellige plasmaprøver. Allikevel er videre optimalisering av ekstraksjonsbetingelsene

nødvendig for å unngå lekkasjer og urene ekstrakter på grunn av proteinenes evne til å emulgere organisk fase. Metoden ble valgt å valideres med hensyn på metaraminol med etilefrin som intern standard. Ekstraksjonstiden ble satt til 45 minutter.

Linearitet

Linearitet ble vurdert i området 0,4 til 40,0 $\mu\text{m/ml}$ metaraminol i plasma. På grunn av konkurrerende matrikskomponenter i urin, ble kvantifiseringsgrensen i urin høyere enn for plasmaprøver. Standardkurven viste linearitet i det testede konsentrasjonsområdet, figur 3-20. Korrelasjonskoeffisienten var $r = 0,9996$.



Figur 3-20: Standardkurve for metaraminol med intern standard i plasma.

Nøyaktighet

Nøyaktighet ble testet for tre ulike konsentrasjoner i plasmaprøver fra tre forskjellige individ. Nøyaktigheten varierte fra $-8,5$ til $8,0$ % avvik fra sann konsentrasjon, tabell 3-13. De høyeste avvikene ble observert for prøver med lav konsentrasjon av legemiddel. Kravet for nøyaktighetsmålinger er mindre enn 15 % avvik fra sann verdi [28]. Ved analyse av plasmaprøver tilfredsstilte metoden kravet FDA har fastsatt for validering av biologiske analysemetoder.

Tabell 3-13: Nøyaktighet og presisjon for metaraminol i plasma (n = 6).

Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Nøyaktighet (Avvik i %)		
	Person 1	Person 2	Person 3
2,0	-3,0	8,0	-8,5
10,0	5,9	3,4	2,4
20,0	7,0	2,3	1,2

Intra-dag presisjon

Intra-dag presisjon ble testet for tre ulike konsentrasjonsnivåer. Presisjonen varierte fra 0,8 til 6,1 % relativt standardavvik, tabell 3-14.

Tabell 3-14: Intra-dag presisjon for metaraminol i plasma (n = 6).

Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)	Intra-dag presisjon (RSD i %)
2,0	6,1
10,0	0,8
20,0	1,0

Presisjonen kan variere på grunn av manuell tillaging av ekstraksjonsenheden og små pipetteringsvolum. Presisjonen lå innenfor FDAs grense på 15 % [28].

Reproduserbarhet

Reproduserbarheten til systemet ble testet ved å analysere plasmaprøver fra tre ulike individ tilsatt 2,0, 10,0 og 20,0 $\mu\text{g/ml}$ i løpet av tre forskjellige dager, tabell 3-15. Reproduserbarheten varierte fra 1,4 til 6,9 % i relativt standardavvik.

Tabell 3-15: Reproduserbarhet for metaraminol i plasma (n = 6).

Konsentrasjon (µg/ml)	Reproduserbarhet (RSD i %)
2,0	6,9
10,0	1,4
20,0	2,4

4 Konklusjon

Ionparmediert LPME er en selektiv, enkel, billig og effektiv prøveopparbeidelsesteknikk for hydrofile forbindelser. Det benyttes små mengder løsemidler i metoden og den vil derfor være et miljøvennlig alternativ til tradisjonell væske-væske ekstraksjon.

Studier av mekanismen som ligger til grunn for ionparmediert transport av hydrofile forbindelser over en organisk fase, tyder på at forbindelsenes kjemiske egenskaper vil styre hvor effektivt ekstraksjonen skjer. Optimalisering er nødvendig for hver enkelt forbindelse som skal ekstraheres for å skape de betingelsene som gir høye ekstraksjonsutbytter innen rimelig tid. Analyttens affinitet for ionpardanneren, ionparkompleksets fordeling inn i og stabilitet i organisk fase er viktige momenter ved optimalisering. Valg av ionpardanner og organisk fase med hensyn på analyttens kjemiske egenskaper vil derfor være to avgjørende faktorer for en effektiv opprensing og oppkonsentrering. Ekstraksjon av hydrofile legemidler fra plasmaprøver gav stabile ekstraksjonsutbytter for legemidlene. Urin derimot er en sterkt varierende matris og innhold av konkurrerende matrisforbindelser kan påvirke ekstraksjonsprosessen. Metoden kan allikevel være robust ved å benytte en intern standard med struktur lik analyttens. Det er viktig med likhet i struktur fordi ekstraksjonsprosessen påvirkes sterkt av forbindelsenes kjemiske egenskaper både når det gjelder ekstraksjonsutbytter, hastighet og presisjon. Gjennom videre arbeid og optimalisering av betingelsene i ionparmediert LPME kan metoden bli et fremtidig verktøy til analyse av hydrofile legemidler og metabolitter. Ved å benytte akseptorløsninger som er kompatible med LC-MS er det mulig å nå langt ned i deteksjons- og kvantifiseringsgrenser, noe som kreves ved for eksempel detaljert metabolismekartlegging.

5 Referanseliste

- [1] S. Andersen, T. G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices, *J Chromatogr A* 963 (2002) 303-312.
- [2] S. Andersen, T. G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, L. Tanum, H. Refsum, Stereospecific determination of citalopram and desmethylcitalopram by capillary electrophoresis and liquid-phase microextraction, *J Pharm Biomed Anal* 33 (2003) 263-273.
- [3] A. Bjørhovde, T. G. Halvorsen, K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Liquid-phase microextraction of drugs from human breast milk, *Analytica Chimica Acta* 491 (2003) 155-161.
- [4] T. G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug, *J Chromatogr A* 909 (2001) 87-93.
- [5] T. S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction, *J Chromatogr A* 963 (2002) 3-17.
- [6] T. S. Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions, *Analyst* 127 (2002) 608-613.
- [7] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal Chem* 71 (1999) 2650-2656.
- [8] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, T. G. Halvorsen, Liquid-liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis, *J Chromatogr A* 902 (2000) 91-105.

- [9] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs, *Electrophoresis* 21 (2000) 579-585.
- [10] K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H. G. Uglund, T. Gronhaug, Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr A* 873 (2000) 3-11.
- [11] T. S. Ho, T. G. Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport, *J Chromatogr A* 998 (2003) 61-72.
- [12] The Merck Index, 13.utgave, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, 2001, s. 2597.
- [13] K. Seta, M. Washitake, T. Anmo, N. Takai, T. Okuyama, High-performance anion-exchange chromatography of ultraviolet-absorbing constituents of human urine, *J Chromatogr* 181 (1980) 311-318.
- [14] K. E. Rasmussen, Bioanalyse og validering av analysemetoder, Unipub kompendier, Oslo, 2000, s. 1-30.
- [15] K. E. Rasmussen, Farmasøytisk bioanalyse, Unipub kompendier, Oslo, 2002, s. 7-18.
- [16] T. Greibrokk, E. Lundanes, K. E. Rasmussen, Kromatografi, 3.utgave, Universitetsforlaget, Aurskog, 1998, s. 246, 275-285 og 291-292.
- [17] H. G. Uglund, M. Krogh, K. E. Rasmussen, Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 749 (2000) 85-92.
- [18] T. Gronhaug Halvorsen, S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 760 (2001) 219-226.

- [19] J. Hadgraft, K. A. Walters, P. K. Wotton, Facilitated transport of sodium salicylate across an artificial lipid membrane by Azone, *J Pharm Pharmacol* 37 (1985) 725-727.
- [20] N. Parthasarathy, M. Pelletier, J. Buffle, Hollow fiber based supported liquid membrane: a novel analytical system for trace metal analysis, *Analytica Chimica Acta* 350 (1997) 183-195.
- [21] S. Pedersen-Bjergaard, *Kjemisk analyse av legemidler med kapillærelektroforese*, Unipub kompendier, Oslo, 1998, s. 1-29.
- [22] D. N. Heiger, *High performance capillary electrophoresis -an introduction*, 2.utgave, Hewlett Packard, Waldbronn, 1992, s.78-82.
- [23] G. Hagelin, *Buffere i kjemi. Blandingstabeller*, 1.utgave, Universitetsforlaget, Kristiansand, 1987, s. 36-37 og 50-51.
- [24] *ACD/ChemSketch, versjon 5.11*, Advanced chemistry development ich., Toronto, 2001.
- [25] S. Pedersen-Bjergaard, T. S. Ho, K. E. Rasmussen, Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs, *J Sep Sci* 25 (2002) 141-146.
- [26] E. Haug, O. Sand, Ø.V. Sjaastad, *Menneskets fysiologi*, 1.utgave, Universitetsforlaget, Oslo, 1992, s. 467.
- [27] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, *Pharmacology*, 4.utgave, Churchill Livingstone, Edinburgh, 1999, s.78-92.
- [28] *Guidance for industry. Bioanalytical method validation*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, 2001.