

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM

TEKNISK UTVIKLING AV ELEKTROMEMBRANISOLASJON

TORILL MARITA ANDERSEN



Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for farmasøytisk kjemi,
Farmasøytisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet,
Universitetet i Oslo.
Oslo 2006

TEKNISK UTVIKLING AV ELEKTROMEMBRANISOLASJON

TORILL MARITA ANDERSEN

Hovedfagsoppgaven ble gjennomført ved avdeling for legemiddelanalyse, kjemisk seksjon, Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo i perioden november 2005 til oktober 2006.

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard
Professor Knut Einar Rasmussen
Stipendiat Astrid Gjelstad
Stipendiat Tung Si Ho

Forord

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen-Bjergaard for god hjelp og oppfølging under planlegging av laboratoriearbeid, og ved oppgaveskrivingen.

En stor takk også til Astrid Gjelstad for hjelp på laboratoriet og for god guiding i Excels verden.

Jeg vil også takke Knut Einar Rasmussen, Tung Si Ho og de andre ansatte på avdelingen for svar på mine spørsmål og for planlegging og gjennomføring av fredagskake.

Til Marte går det en spesialtakk fordi du har gjort dagene ved labbenken morsomme og utholdelige, også de dagene da kapillærene ikke var på min side. Jeg vil også takke de andre kontorkameratene mine Hanne, Petter og Kari for et trivelig og godt arbeidsmiljø.

Tilslutt en varm takk til deg Nicolai for god støtte, og for at du reddet meg når PC'n ble invadert av mystiske, kinesiske tegn!

Oslo, oktober 2006

Torill Marita Andersen

Innholdsfortegnelse

Forord	3
Innholdsfortegnelse	4
Forkortelser	6
Sammendrag.....	7
1 Introduksjon	9
2 Eksperimentelt.....	12
2.1 Utstyr og prosedyrer for EMI.....	12
2.2 Utstyr og prosedyrer for LPME:.....	13
2.3 Kapillærelektroforese.....	14
2.4 Kjemikalier	14
2.5 Standardløsninger og prøver.....	14
2.6 Beregning av utbytte og oppkonsentrering.....	15
3 Resultat og diskusjon	16
3.1 Innledende forsøk.....	16
3.2 EMI sammenlignet med LPME i 3 ulike formatstørrelser	19
3.2.1 EMI og LPME lite format.....	19
3.2.2 EMI og LPME middels format	21
3.2.3 EMI og LPME stort format.....	23
3.3 Hulfiber	25
3.3.1 Ulike fibertyper	25
3.3.2 Loop-fiber	25
3.3.3 Loop-fiber kombinert med magnetrører.....	26
3.3.4 Gjenbruk av hulfiber.....	26
3.3.5 Acetonvask av hulfiber.....	27
3.4 Fornyelse av akseptorfase.....	28
3.4.1 Innledende forsøk med fornyelse av akseptorfase	28
3.4.2 Fornyelse av akseptorfase 5+25 minutter.....	29
3.4.3 Tidskurve med fornyelse av akseptorfase.....	30
3.4.4 Flow	31
3.5 Analyse av donorfase og akseptorfase	32
3.5.1 Konsentrasjon av analytter i donorfase	32

3.5.2	Konsentrasjon av analytter i akseptorfase	33
3.5.3	Total mengde detektert legemiddel	34
3.5.4	Intern påvirkning mellom legemidler under ekstraksjon.....	35
3.6	Volumendringer av akseptorfase og donorfase	36
3.6.1	Volumendringer av akseptorfase.....	36
3.6.2	Volumendringer av donorfase.....	37
3.6.3	Endring av polaritet i donorfase.....	38
4	Konklusjon	39
5	Referanseliste	40

Forkortelser

µg	Mikrogram
µL	Mikroliter
E	Oppkonsentreringsfaktor
EMI	Elektromembranisolasjon
CE	Kapillærelektroforese
cm	Centimeter
GC	Gasskromatografi (Gas chromatography)
HCl	Saltsyre (Hydrochlorid acid)
HPLC	Væskekromatografi (High performance liquid chromatography)
i.d	Indre diameter
LLE	Væske-væske ekstraksjon (Liquid-liquid extraction)
LPME	Væskefasemikroekstraksjon (Liquid-phase microextraction)
mA	Mikroampere
mL	Milliliter
mM	Millimolar
NaCl	Natriumklorid
NaOH	Natriumhydroksid
NPOE	2-nitrofenyloktyl eter
P	Prøveløsning
psi	Pounds per square inch (1 psi = 68,93 mbar = 6,893 x 10 ³ Pa)
R	Utbytte (Recovery)
Rpm	Runder per minutt
RSD	Relativt standardavvik
SPE	Fast fase ekstraksjon (Solid phase extraction)
UV	Ultrafiolett
V	Volt

Sammendrag

I denne oppgaven har 5 basiske stoffer blitt elektrokinetisk ekstrahert over en tynn, organisk væskemembran med 15 V elektrisk potensialdifferanse som drivkraft. Den kunstige væskemembranen har bestått av 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) immobilisert i porene på en polypropylen hulfiber. For å få analyttene mest mulig ut av den organiske membranen og over i akseptorfasen har denne bestått av 10 mM HCl. En katode har blitt plassert inne i akseptorfasen i hulfiberen, og en anode har blitt plassert i donorfase. Oppsettet har blitt koblet til en spenning på 15 V samtidig som det ble satt fast på en vibrasjonsmikser med 1000 rpm, begge deler i 5 minutter som standardoppsett. De basiske legemiddelanalyttene har dermed som følge av elektrisk potensialdifferanse migrert over membranen og inn mot katoden i akseptorfasen. Akseptorfasen har blitt analysert ved kapillærelektroforese (CE).

Med utgangspunkt i et standardoppsett har tekniske og noen kjemiske betingelser for ekstraksjonsmetoden variert i ulike forsøk med tanke på å øke utbyttene og teste ut parametere som kan ha innvirkning på ekstraksjonen. Ekstraksjonsmetoden har blitt sammenlignet med LPME i 3 ulike størrelsesformater for å se hvilken betydning størrelsen på prøvevialer kan ha på ekstraksjonen, og for å sammenligne ekstraksjonsmetodene med hverandre. Resultatene fra disse forsøkene viste at ekstraksjoner utført med EMI kom til likevekt vesentlig raskere enn ekstraksjoner utført med LPME, og at formatet som egnet seg best til ekstraksjon var standardformatet. Polypropylenfiberen ble forsøkt erstattet med 3 ulike fibertyper. Først ble det gjort forsøk med en polyetersulfon fiber og en polysulfonfiber uten at det var særlig vellykket. Så ble en polypropylenfiber med i.d 600 μm forsøkt. Denne ble festet til to sprøytespisser slik at den dannet en loop. Under ekstraksjonene med loop-fiberen ble spenningskilden koblet direkte til sprøytespissene slik at disse fungerte som katode. Utbyttene fra loop-fiberen var vesentlig høyere enn for standardfiberen, og loop-fiberen ble benyttet ved ett senere forsøk der akseptorfasen ble pumpet kontinuerlig igjennom ekstraksjonsfiberen underveis i ekstraksjonen. Akseptorfasen har blitt fornyet underveis i ekstraksjonene på flere ulike måter for å hemme dannelsen av en konsentrasjonsgradient i akseptorfase inne i hulfiberen. Ved en slik fornyelse av akseptorfase ble ekstraksjonsutbyttene høyere enn ved ekstraksjoner utført uten fornyelse av akseptorfase.

Arbeidet med denne oppgaven har ikke gitt noen store framskritt med tanke på å øke ekstraksjonsutbyttet, men gir likevel verdifull informasjon som kan benyttes i det fremtidige arbeidet med videreutvikling av ekstraksjonsmetoden.

1 Introduksjon

I legemiddelanalyse av biologiske prøver brukes det i dag mye tid på prøveopparbeidelse som oppkonsentrering og opprensing. Analyttene i prøvematerialet foreligger oftest i svært lave konsentrasjoner (0.1-10 ng/ mL nivå), og materialet inneholder komplekse molekyler som vil interferere i kromatografiske kolonner. Oppkonsentrering og opprensing er derfor en nødvendighet før videre analyse. De tradisjonelle metodene som væske-væske ekstraksjon (LLE) og fast-fase ekstraksjon (SPE) har flere ulemper, blant annet høyt forbruk av organiske løsemidler, stort forbruk av prøvemateriale (1 mL) og flere analysetrinn for å få analyse materialet klart for videre analyse i for eksempel gaskromatografi (GC), high-performance liquid chromatography (HPLC) eller kapillærelektroforese (CE). LLE er i tillegg vanskelig å automatisere [1-3]. En ekstraksjonsmetode som har vært under utvikling de senere år for å forbedre prøveopparbeidelse, er ekstraksjonsmetoden væskefase-mikroekstraksjon (LPME). LPME er en mikronisert utgave av LLE. LPME kan være en to-fase eller tre-fase væske-væske mikroekstraksjon. I tre-fase LPME ekstraheres analyttene fra en vandig prøve (donorfase) gjennom en hul og porøs polypropylenfiber som er impregnert med et organisk løsningsmiddel, og fanges deretter opp i lumen av fiberen hvor det er en vandig mottakerløsning (akseptorfase). Den organiske fasen fungerer som en barriere mellom donorfase og akseptorfase og hindrer blanding av disse. Ekstraksjon av analyttene baserer seg på passiv diffusjon og analyttene foreligger derfor på uionisert form i donorfasen, mens pH i akseptorfase er justert slik at analyttene ioniseres og lettere trappes ut av den organiske membranen [2, 4-8]. To-fase LPME foregår på samme måte som tre-fase LPME, men i motsetning til tre-fase LPME består akseptorfase av et organisk løsningsmiddel slik at analyttene ekstraheres fra en vandig donorfase via en polypropylenfiber impregnert i et organisk løsningsmiddel, til en organisk akseptorfase. To-fase LPME er direkte kompatibel med GC da akseptorfase kan injiseres direkte inn i apparatet [1]. I motsetning til mer tradisjonelle ekstraksjonsmetoder er forbruket av organiske løsningsmidler i LPME ekstremt lavt (20 mikroliter per prøve). LPME har et stort potensiale da forsøk har vist at både sure, basiske og nøytrale legemidler lar seg ekstrahere [1, 9, 10]. LPME fungerer godt ved at prøvematerialet både opprenses og oppkonsentreres i en og samme operasjon. Fordi akseptorfase er vandig i tre-fase LPME er den direkte injiserbar i HPLC og CE.

Tidligere har det blitt vist at elektrokinetisk migrasjon kan utføres i et vandig to-fasesystem hvor de to vannfasene er separert med ulike vannløselige polymere. Transport skjer mellom grenseflaten til fasene. I slike system plasseres en elektrode i hver fase og et elektrisk felt skapes i systemet når det settes spenning til. Ladete kjemiske forbindelser migrerer mot elektrodene og krysser over fra en fase til den andre og lar seg slik separere [11-14]. Det har også blitt vist at separasjon av stoffer kan skje mellom en vandig og en organisk fase hvor de to fasene ikke er blandbare med hverandre [15-22].

I den senere tid har det blitt publisert to artikler angående en ny ekstraksjonsmetode basert på elektrokinetisk migrasjon. Ekstraksjonsmetoden kalles elektromembranisolasjon (EMI) og kan sees på som en videreutvikling av LPME hvor strøm kobles til et trefasesystem og isolasjonen baserer seg på elektrisk potensialdifferanse [23, 24]. EMI har hittil kun vært testet i tre-fasesystem. Tre-fase EMI baserer seg på samme oppbygning som tre-fase LPME beskrevet overfor. I EMI settes det i tillegg en elektrode i donorfase og en i akseptorfase, og ved å sette spenning på systemet vil ladete ioner migrere fra en vandig donorfase over en organisk kunstig væskemembran som følge av elektrisk potensialdifferanse, og samles opp i en vandig mottakerløsning (akseptorfase). Migrasjonen skjer relativt raskt, og etter 5 minutter med ekstraksjon er utbyttene oppe i 70-79% [24].

Sammenlignet med LPME ligger det et stort potensiale i tidsbesparelse med EMI. Siden EMI ble beskrevet for første gang publiserte Gjelstad med flere en artikkel i mai 2006 [23] hvor 20 ulike basiske legemiddelanalytter ble forsøkt ekstrahert med litt ulik sammensetning av den organiske væskemembranen. Artikkelen viste at sammensetningen av den organiske væskemembranen hadde stor betydning for om stoffer lot seg ekstrahere ved bruk av EMI. En væskemembran av ren 2-nitrofenyloktyl eter (NPOE) fungerte bra ved ekstraksjon av upolare stoffer, mens det krevdes en tilsetning av di-(2-etylhexyl) fosfat (DEHP) for å ekstrahere polare stoffer.

De resultater som har blitt publisert rundt EMI hittil har vist at bruk av elektrisk potensialdifferanse som drivkraft for migrasjon av ladete ioner, kan fungere som ekstraksjonsmetode. Forsøkene som har vært gjort så langt har dreid seg om migrasjon av basiske stoffer. Fordi utviklingen av EMI som ekstraksjonsmetode er helt i startfasen, gjenstår mye forskning for å finne ut flere betingelser for bruk av EMI.

Arbeidet i denne oppgaven sammenligner EMI med LPME og tar også for seg endringer av det tekniske format i et forsøk på å øke ekstraksjonsutbyttet.

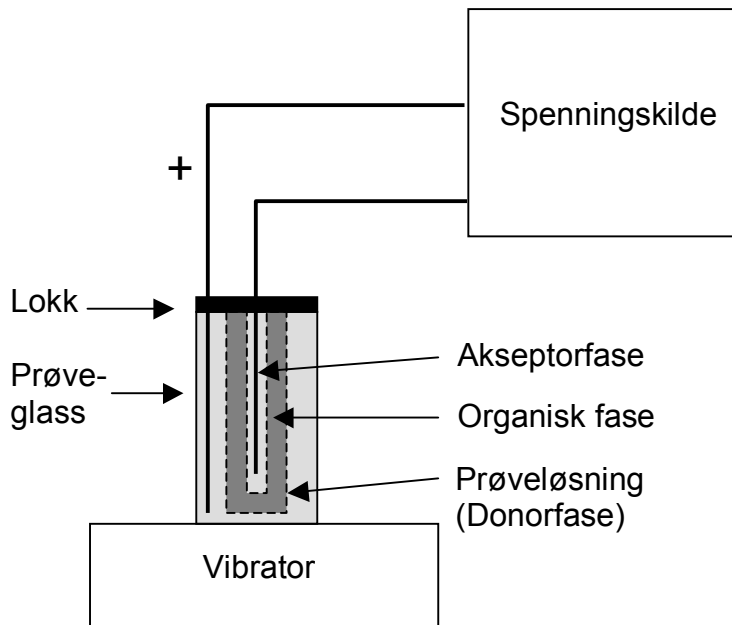
2 Eksperimentelt

2.1 Utstyr og prosedyrer for EMI

Oppsett av utstyr er vist i figur 1. Spenningskilden som ble brukt var av type Delta elektronika power supply ES 0300-0,45 (Zierikzee, Nederland) med justerbar spenning i området 0-300 V, og med strømstyrke i området 0-450 mA. Det ble brukt platinatråd med en diameter på 0,5 mm (K.A. Rasmussen, Hamar, Norge) som elektrode. Disse var koblet til spenningskilden. Prøvebeholder for donorfase var i de fleste tilfeller 1,5 mL polypropylenvialer med lokk, nummer 780500 fra Brand (Wertheim, Tyskland). Den porøse hulfiberen som ble brukt til immobilisering av den kunstige væskemembranen, og til å oppbevare akseptorfase i, var en PP Q3/2 polypropylen hulfiber (Membrana, Wuppertal, Tyskland) med en indre diameter på 1,2 mm, veggtykkelse 200 μm og porestørrelse 0,2 μm . Det ble ved en anledning forsøkt ulike fibertyper. De typene som ble forsøkt i tillegg til fiberen beskrevet over var polypropylen hulfiber 600 μm i.d, veggtykkelse 200 μm og porestørrelse 0,2 μm (Membrana), polysulfon hulfiber 1,6 mm i.d med ukjent veggtykkelse og 0,2 μm porestørrelse og polyetersulfon hulfiber 1,5 mm i.d, ukjent veggtykkelse og 0,2 μm porestørrelse (begge fra Celgard Inc., NC, USA). Under ekstraksjonene var hele prøveoppsettet fastsatt på en vibrasjonsmikser Vibramix100 (Heidolph, Kelheim, Tyskland) ved 1000 rpm. Det ble ved ett forsøk brukt magnetrører TYP M10 (Framo-Gerätetechnik, Eisenbach, Tyskland), rørehastighet ikke oppgitt, i stedet for vibrasjonsmikser.

Følgende prosedyre ble brukt under forsøkene ved EMI: 300 μL sur prøveløsning ble pipettert inn i en prøvebeholder av polypropylen. Positiv elektrode ble så plassert i prøvebeholderen. En hul polypropylenfiber med lengde 3,1 cm ble lukket i enden ved hjelp av mekanisk trykk, og ble deretter loddet fast til en 2, 2 cm lang polypropylen pipettespiss (Finntip 200 Ext fra Thermo Electron, Vantaa, Finland), pipettespissen fungerte som en mekanisk støtte og leder. Fiberen med påfestet pipettespiss ble deretter dyppet i organisk fase (NPOE) i 5 sekunder, og overskudd av organisk fase ble så tørket forsiktig av med medisinsk tørkepapir. Akseptorfase (vanligvis 30 μL) ble injisert inn i lumen på fiberen ved hjelp av en mikrosprøyte, og negativ elektrode ble plassert i akseptorfase inne i lumen av fiberen. Tilslutt ble fiber med akseptorfase og elektrode plassert i vialen som inneholdt den positive elektroden og prøveløsningen, og det hele ble plassert på vibrasjonsmikser, se figur 1. Spenning 15 V ble satt på i 5 minutter. Etter endt ekstraksjonstid ble akseptorfase overført til en mikrotube for

analyse i CE. Ved ett forsøk ble det benyttet små glassvialer, nummer 03-NV (lengde 3 cm, i.d. 3,5 mm) og nummer 2-SV (lengde 2,5 cm, i.d. 1 cm) (Chromacol Ltd. Wewyn Garden City, UK). Det ble ved en anledning benyttet en dilutor-dispenser (Gilson, Villiers-le-Ble, Frankrike) for å pumpe akseptorfase kontinuerlig igjennom fiberen.



Figur 1. Ekstraksjonsoppsett for EMI

2.2 Utstyr og prosedyrer for LPME

Det ble fylt 300 μL basisk prøveløsning inn i glassvialer, 2 ml (2-SV og 2-DV Chromacol Ltd., Herts, UK). En 2,3 cm polypropylen hulfiber 1,2 mm i.d med veggtykkelse 200 μm og 0,2 μm porestørrelse (Membrana) ble lukket i enden ved hjelp av mekanisk trykk og deretter loddet fast til en 2,2 cm lang polypropylen pipettespiss (Finntip 200 Ext fra Thermo Electron). Pipettespiss med påfestet hulfiber ble deretter dyppet 5 sekunder i organisk fase (NPOE) og overskudd av organisk fase ble forsiktig tørket at med medisinsk tørkepapir. Deretter ble hulfiberen fylt med 20 μL 10 mM HCl akseptorfase ved hjelp av en mikropipette, og det hele ble ført igjennom en kork med silikonseptum (8-SC 425 Chromacol Ltd., Wewyn Garden City, UK). Fiberen ble plassert ned i glassvialen inneholdende basisk prøveløsning, og ble deretter satt på vibrasjonsmikser, 1000 rpm.

2.3 Kapillærelektroforese

Kapillærelektroforese ble utført med et MDQ instrument (Beckman, Fullerton, CA, USA) utstyrt med en UV-detektor. Stoffene ble separert i et 77- μm -I.D fused silica kapillær med 50 cm effektiv lengde (Polymicro Technologies, AZ, USA). Separasjonsbuffer var 25 mM fosfatbuffer justert til pH 2,75 med orto-fosforsyre. Bufferen ble oppbevart lysbeskyttet i romtemperatur (20 °C) og ble filtrert før bruk. Separasjonsspenningen var 30 kV som genererte en strøm på omtrent 60 μA . Prøvene ble injisert ved hydrodynamisk injeksjon 0,5 psi i 5 sekunder. Deteksjon ble utført ved 200 nm med en spalte (100 μm \times 800 μm) i kapillæret.

2.4 Kjemikalier

Petidin hydroklorid, nortriptylin hydroklorid, metadon hydroklorid, haloperidol og loperamid hydroklorid kom alle fra Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2-Nitrofenyl oktyl eter (NPOE) kom fra Fluka (Buchs, Sveits). Saltsyre, orto-fosforsyre, natriumdihydrogenfosfat monohydrat og natriumklorid var fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Aceton var fra Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, Frankrike), etanol kom fra Arcus (Oslo, Norge).

2.5 Standardløsninger og prøver

Det ble laget en felles stamløsning av hver legemiddelsubstans i etanol, 1 mg/mL. Stamløsningen ble oppbevart i romtemperatur (20 °C) og lysbeskyttet. Prøveløsninger ble laget daglig ved å fortynne stamløsningen med 10 mM HCl for EMI, og 100 mM NaOH for LPME.

2.6 Beregning av utbytte og oppkonsentrering

Utbyttet (R) kan regnes ut etter følgende ligning for hver analytt:

$$R = \frac{n_{a, \text{endelig}}}{n_{p, \text{inituell}}} \cdot 100\% = \left(\frac{V_a}{V_p} \right) \left(\frac{C_{a, \text{endelig}}}{C_{p, \text{inituell}}} \right) \cdot 100\%$$

hvor $n_{p, \text{inituell}}$ er antall mol analytt opprinnelig tilstede i donorfase og $n_{a, \text{endelig}}$ er antall mol tilstede i akseptorfase etter endt ekstraksjon. V_a er volum av akseptorfase og V_p er volum av donorfase. C_a er den endelige konsentrasjonen av analytt i akseptorfase, og $C_{p, \text{inituell}}$ er den initielle analyttkonsentrasjonen i donorfase [24].

I praksis ble utbyttet beregnet ved bruk av topparealer fra elektroferogrammer etter analyse av standardløsning og akseptorfase etter ekstraksjon:

$$R = \frac{\text{toppareal}_{a, \text{endelig}}}{\text{toppareal}_{std}} \cdot \frac{C_{std} V_a}{C_{p, \text{inituell}} V_{p, \text{inituell}}} \cdot 100\%$$

C_{std} er konsentrasjon i standardløsning. Fordi det var mer praktisk ble konsentrasjon og volum av donorfase før ekstraksjon brukt i utregningene. Andre ledd i formelen korrigerer for eventuelle endringer i volum av donorfase.

Oppkonsentreringsfaktoren (E) ble regnet ut etter følgende ligning for hver analytt:

$$E = \frac{C_{a, \text{endelig}}}{C_{p, \text{inituell}}}$$

3 Resultater og diskusjon

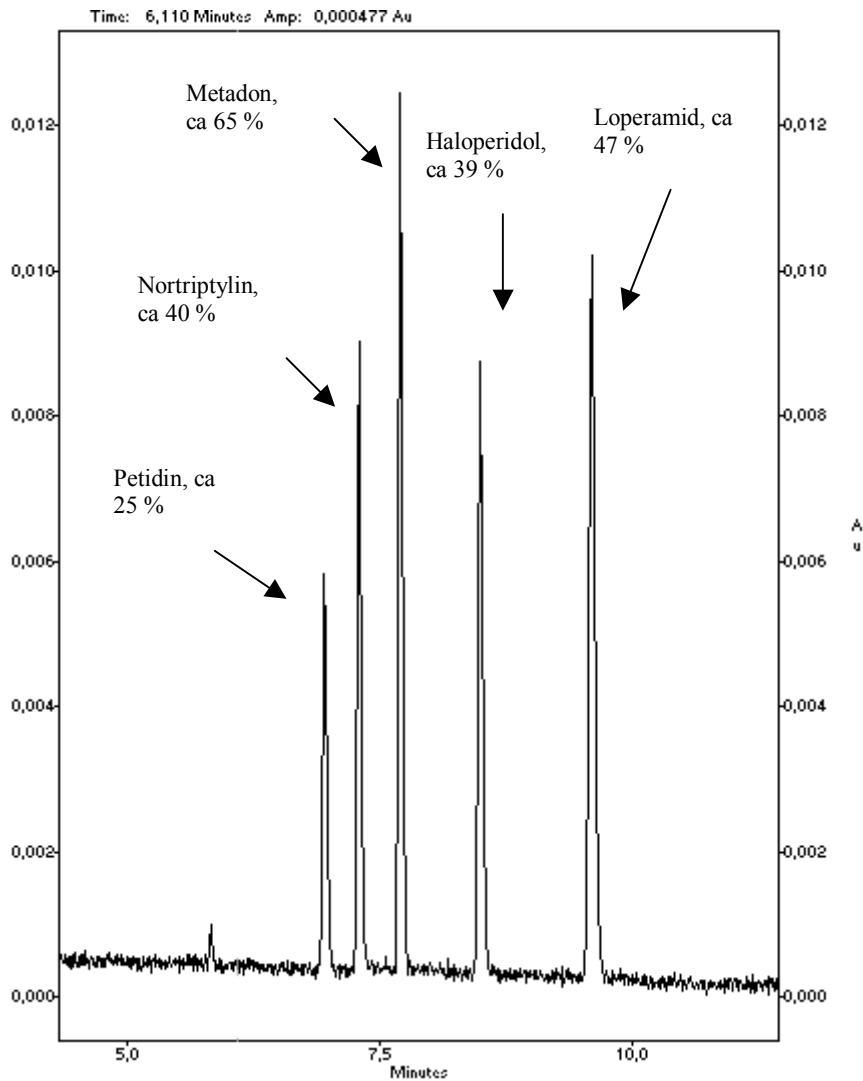
3.1 Innledende forsøk

Standardoppsettet er basert på bakgrunn av tidligere publiserte data [23, 24]. Det ble valgt å fortsette bruken av de samme legemidlene som modellsubstanser i dette arbeidet, se tabell 1. De er alle basiske, og høy log P verdi viser at de er relativt hydrofobe. Tidligere forsøk har vist at disse legemidlene har latt seg ekstrahere med EMI ved bruk av 2-nitrofenyloktyl eter (NPOE) som kunstig organisk væskemembran. Donorløsninger laget ved fortyninger fra stamløsning (1 mg/mL i etanol) i 10 mM HCl og bruk av 10 mM HCl som akseptorfase, gav utbytter rundt 70-79 % ved 300 V [24]. Av sikkerhetsmessige og praktiske årsaker ble det i dette arbeidet valgt å forsøke en spenning på 15 V. Prinsippet for EMI er skissert i figur 1.

Donorfasen ble surgjort med HCl til $\text{pH} \approx 2$ for å få de basiske legemiddelanalyttene over på ionisert form, og 300 μL donorfase ble pipettert over i en polypropylenvial. En positiv elektrode (anoden) ble plassert i vialen. En hul polypropylenfiber med indre diameter på 1,2 mm ble forseglet i en ende ved hjelp av mekanisk trykk, og ble deretter dyppet 5 sekunder i NPOE og tørket forsiktig av med medisinsk tørkepapir. NPOE ble immobilisert i porene på fiberen og utgjorde en kunstig, organisk væskemembran. Basert på veggtykkelsen til polypropylenfiberen utgjorde væskemembranen en tykkelse på ca 200 μm . 30 μL 10 mM HCl i vann ble injisert i fiberens lumen, og dette utgjorde akseptorfase. En negativ elektrode (katoden) ble så plassert i akseptorfase, og fiber med katode ble plassert i vialen som inneholdt donorfase og anode. Oppsettet ble plassert på vibrasjonsmikser med 1000 rpm, elektrodene ble koblet til strømkilden og spenning på 15 V ble satt på i 5 minutter. Som følge av den elektrokinetiske potensialdifferansen som oppstod når spenning ble satt over systemet, ble de basiske legemiddelanalyttene som var positivt ladd i donorfasen, trukket mot den negative elektroden i akseptorfase og således ført igjennom den organiske væskemembranen. For at analyttene skulle trappes i størst mulig grad i akseptorfase, ble pH regulert slik at analyttene også var ioniserte i akseptorfase. Etter endt ekstraksjon ble akseptorfase, 30 μL , overført med mikrosprøyte til CE-apparatet for analyse.

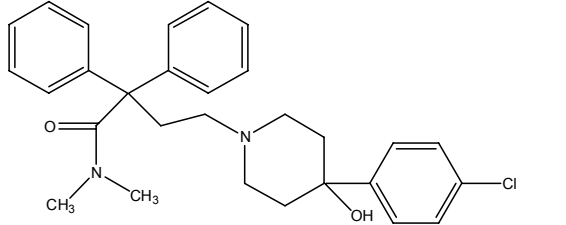
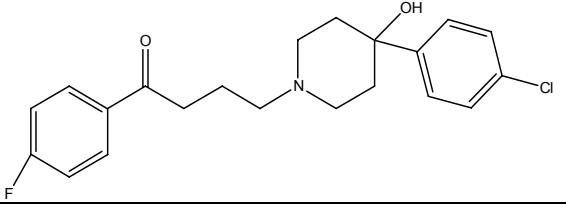
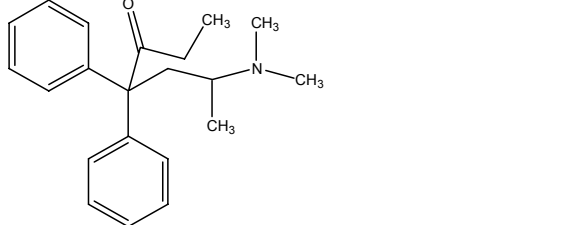
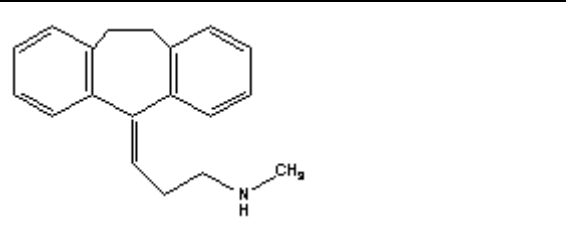
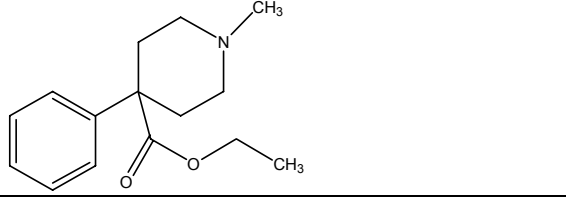
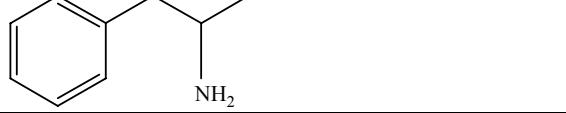
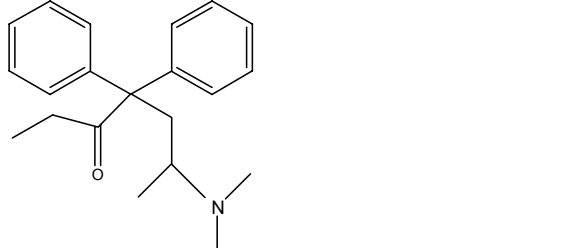
Figur 2 viser elektroferogram fra CE av akseptorfase etter 5 minutter med EMI ved 15 V. Elektroferogrammet viser at fem modellsubstanser ble ekstrahert over til akseptorfase ved betingelsene nevnt over. Amfetamin og metamfetamin lot seg ikke påvise i

elektroferogrammet. Utbyttene for de andre stoffene lå mellom 25-70 %, og det ble vurdert som tilfredsstillende å fortsette forsøkene med utgangspunkt i data beskrevet overfor.



Figur 2. Utbytter i %, elektroferogram fra analyse i CE, EMI er utført etter standardoppsett i 5 minutter.

Tabell 1. Strukturformler for legemidlene

Loperamid		pKa = 8,7 log P = 5,2
Haloperidol		Pka = 8,3 log P = 3,2
Metadon		pKa = 8,3 log P = 2,1
Nortriptylin		pKa = 9,7 log P = 1,7
Petidin		pKa = 8,7 log P = 2,7
Amfetamin		pKa = 9,9 log P = 1,8
Metamfetamin		pKa = 10,2 log P = 2,1

3.2 EMI sammenlignet med LPME i 3 ulike formatstørrelser

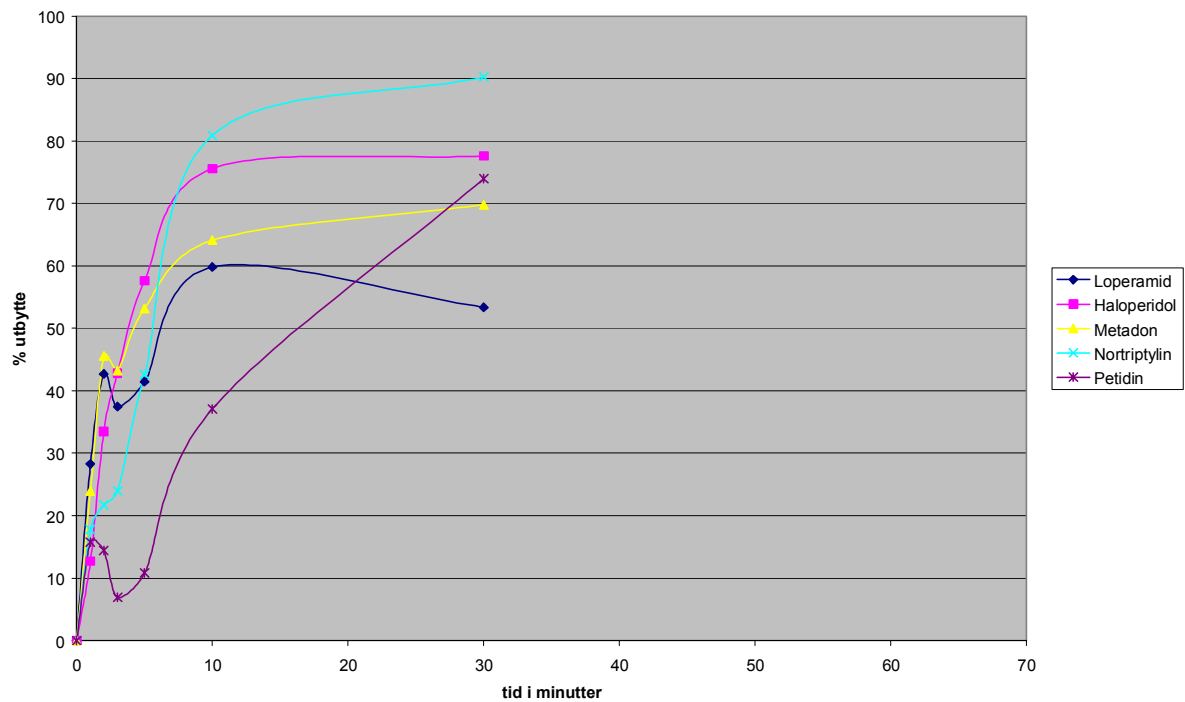
I de innledende forsøkene i dette arbeidet ble det sett på som interessant å sammenligne EMI med LPME. EMI er utviklet med utgangspunkt i LPME, og det har ikke vært gjort noen direkte sammenligninger av de to ekstraksjonsmetodene tidligere. Det ble bestemt å sammenligne LPME mot EMI i 3 ulike formatstørrelser. Ulik størrelse på vialene til donorfase vil kunne ha innvirkning på utbyttet. Når diameteren på vialen minsker, vil fylningsgraden i vialen øke, og kontaktoverflaten mellom donorfase og fiber øker. Det vil også bli endringer i agitasjon fra vibrasjonsmikser. Det ble valgt å utføre EMI og LPME med 2 ulike formatstørrelser i tillegg til den som brukes i standardoppsettet, beskrevet i kapittel 2.2 og 3.1. Den minste vialen var en glassvial med lengde 3 cm og i.d. 3,5 mm. Den mellomste størrelsen (=standard) var en polypropylenvial med lengde 4 cm og i.d. 6 mm, og den største var en glassvial med lengde 2,5 cm og i.d. 10 mm. For at det skulle være lik mengde legemiddel i donorfase på de ulike størrelsene, ble konsentrasjonen endret i henhold til volum som skulle fylles i vialen. De minste vialene ble fylt med 120 μL 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donorfase, de mellomstore vialene ble fylt med 300 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donorfase, og de største vialene ble fylt med 700 μL 0,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donorfase. Hulfiberen var den samme som ble brukt i standardoppsett, men for at fiberen skulle passe i alle 3 formater ble lengden regulert til 2,3 cm. Akseptorfase var 20 μL 10 mM HCl. Foruten de endringer som er beskrevet over, ble ekstraksjonene utført som beskrevet i standardoppsettet.

LPME og EMI ble utført på de tre ulike formatene, og det ble satt opp tidskurve for hver av størrelsene både på LPME og EMI med 3 paralleller på hver tid ($n=3$). Ekstraksjonstidene i LPME var 5, 10, 30 og 60 minutter, og 1, 2, 3, 5, 10 og 30 minutter ved EMI.

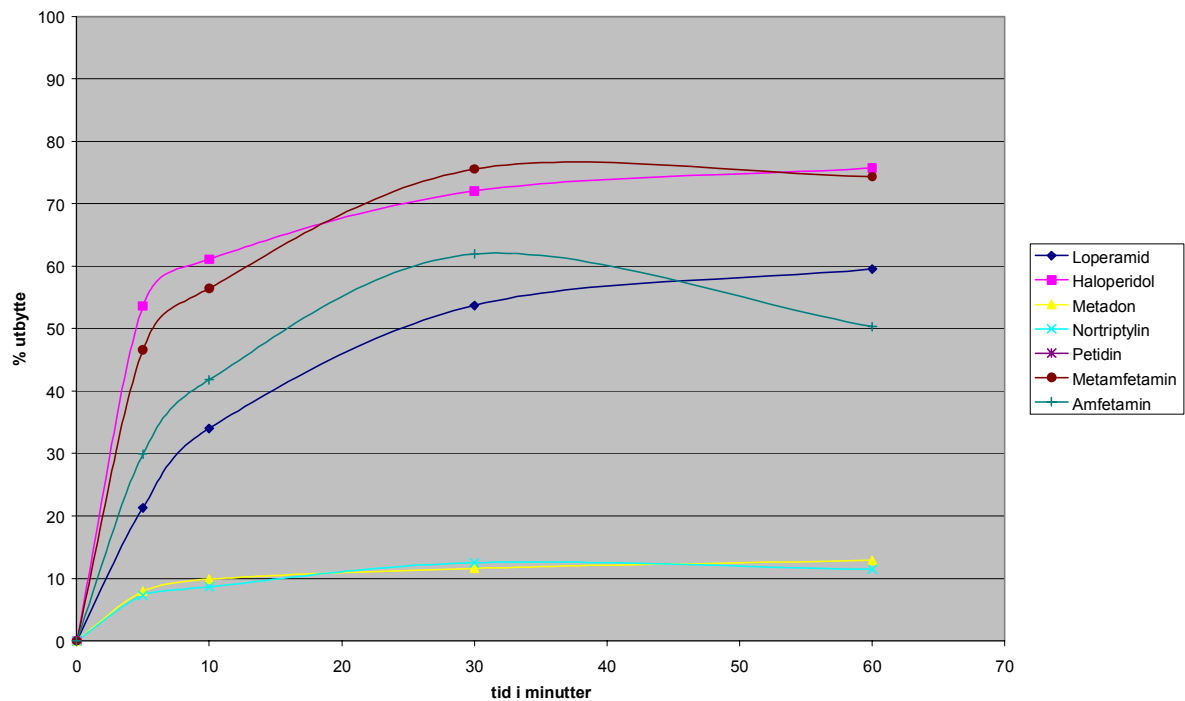
3.2.1 EMI og LPME lite format

Etter 10 minutters ekstraksjonstid ved EMI lite format lå utbyttene rundt 35-80 %, mens utbyttene med LPME lite format lå rundt 10-60 %. Se figur 3 og 4. Det måtte ekstraheres i ca 30 minutter før utbyttene ved LPME lite format kom opp på samme nivå som ved 10 minutters ekstraksjon med EMI lite format. Metadon som lot seg ekstrahere godt ved EMI (65 % etter 10 minutter), lot seg ekstrahere i liten grad med LPME i dette formatet. Petidin lot seg ikke ekstrahere med LPME i dette formatet bortsett fra små spor av stoffet i enkelte

elektroferogram. Stoffene amfetamin og metamfetamin lot seg kun ekstrahere ved hjelp av LPME.



Figur 3. Ekstraksjonsutbytter for EMI lite format som funksjon av tiden.

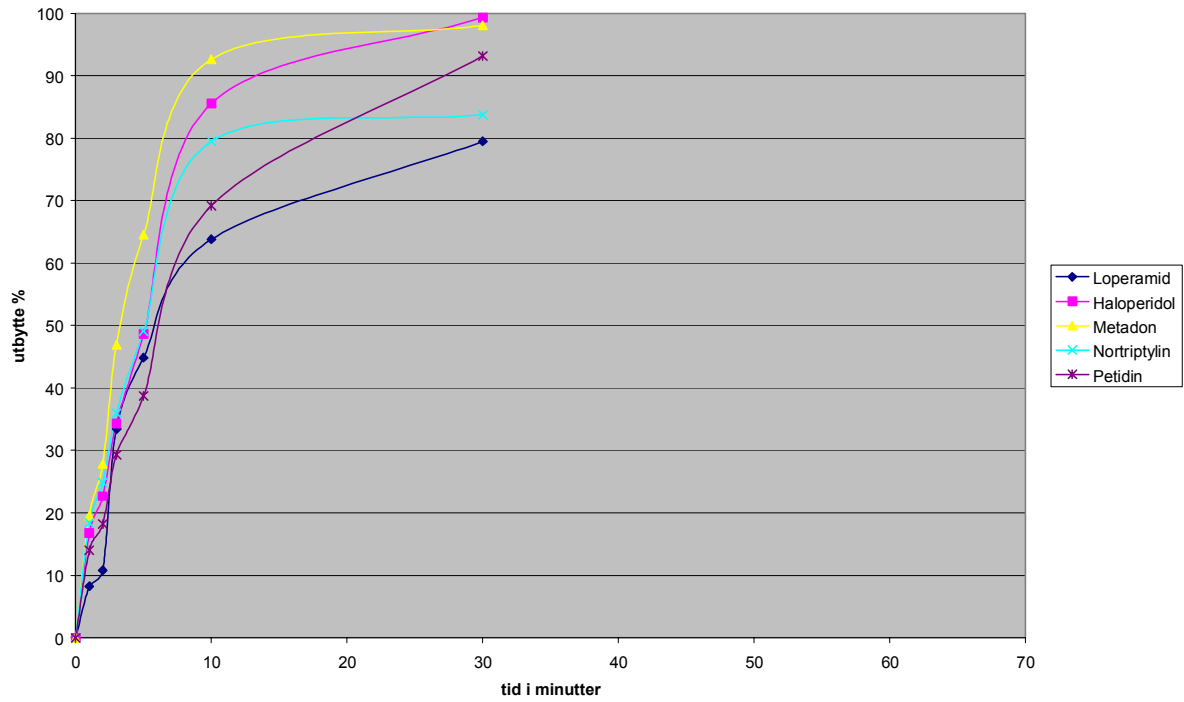


Figur 4. Ekstraksjonsutbytter for LPME lite format som funksjon av tiden.

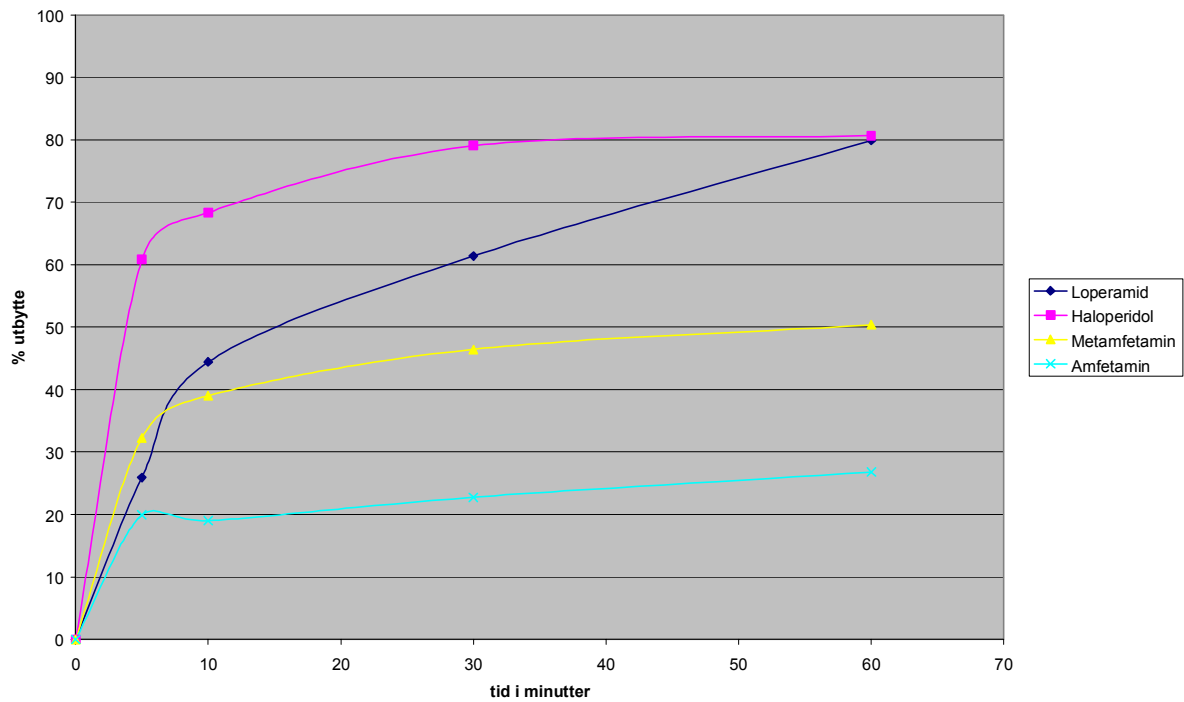
3.2.2 EMI og LPME middels format

I det mellomste formatet (standardformat) gav ekstraksjoner ved bruk av EMI utbytter på ca. 40-60 % allerede etter 5 minutter, mens utbyttene etter 10 minutter lå rundt 65-90 %. Ytterlig forlengelse av ekstraksjonstid gav lite økning i utbyttene for EMI middels format, se figur 5.

Ekstraksjoner gjort med LPME i det mellomste formatet gav utbytter på ca 45-65 % etter 10 minutter, og 60-80 % etter 30 minutter, se figur 6. Metadon og nortriptylin ble registrert i elektroferogrammet etter CE, men i så små mengder at det ikke gav målbare arealer. Petidin ble ikke registrert i elektroferogrammet. Det ble ikke gjort noe forsøk for å finne ut hvorfor disse stoffene ikke lot seg ekstrahere, men fordi problemet ikke oppstod ved LPME i de andre formatstørrelsene der glassvialer ble benyttet til donorfasene, kan en teori være adhesjon av stoffene som ikke lot seg ekstrahere, til polypropylenvialen som ble brukt til middels format.



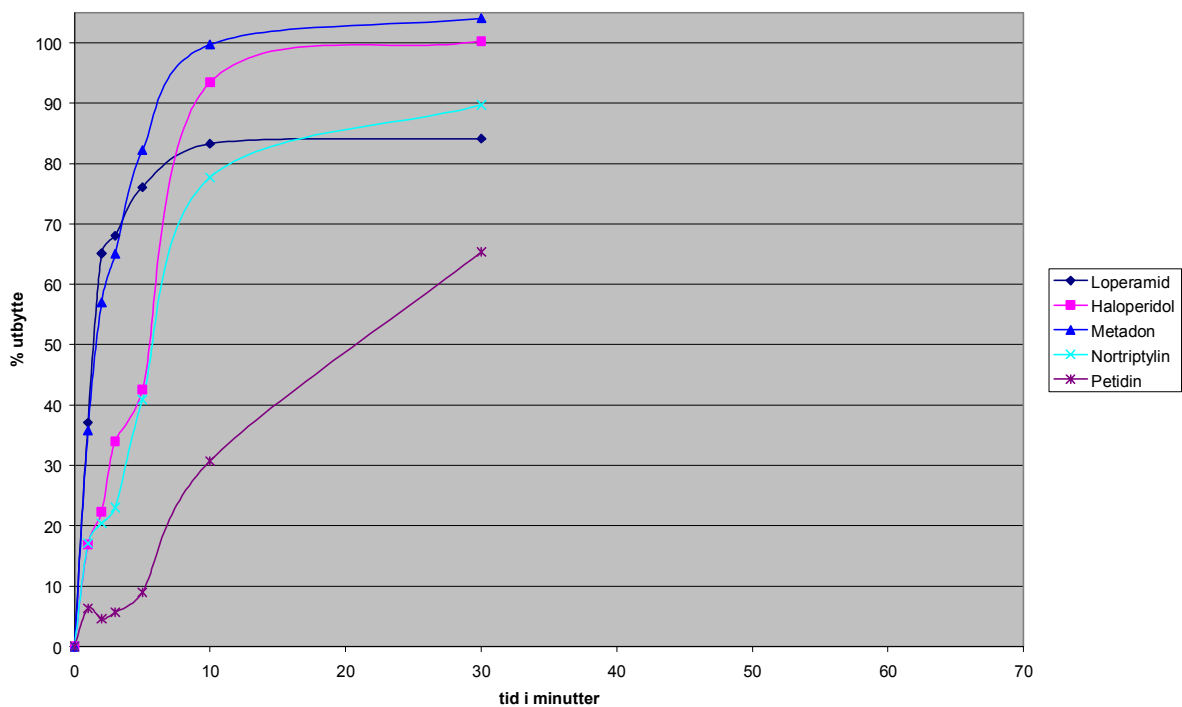
Figur 5. Ekstraksjonsutbytter for EMI middels format som funksjon av tiden.



Figur 6. Ekstraksjonsutbytter for LPME i middels format som funksjon av tiden.

3.2.3 EMI og LPME stort format

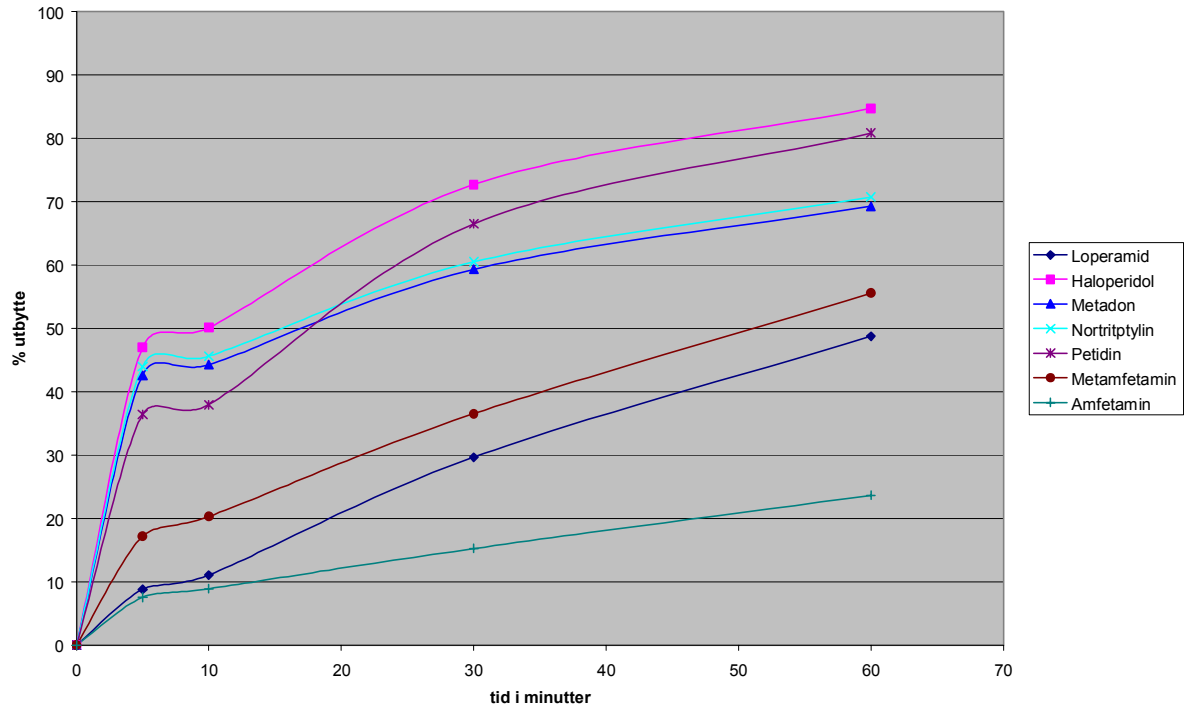
Ekstraksjonsutbytter for EMI stort format gav også relativt gode utbytter etter 10 minutters ekstraksjon, på lik linje med EMI middels format. I det største formatet var utbyttene etter 10 minutters ekstraksjon med EMI ca 75-100 % for alle stoffer unntatt petidin hvor utbyttet var ca 30 %. Det ble lite økning i utbyttene når ekstraksjonstiden passerte 10 minutters ekstraksjon, bortsett fra for petidin hvor utbyttet økte jevnt opp til 30 minutter. Petidin ble raskere ekstrahert over i akseptorfase i EMI middels format.



Figur 7. Ekstraksjonsutbytter for EMI stort format som funksjon av tiden.

Ved LPME stort format var utbyttene ca 35-50 % etter 10 minutter ekstraksjonstid, og etter 30 min var utbyttene på ca 60-75 % mens de økte til ca 70-85 % etter 1 times ekstraksjon.

Det er dette formatet som benyttes på Farmasøytisk Institutt, UIO ved utførelse av LPME ekstraksjoner i dag, og ekstraksjonstiden er vanligvis 45 min.



Figur 8. Ekstraksjonsutbytter for LPME stort format som funksjon av tiden.

Ut i fra forsøkene gjort over ble det valgt å fortsette videre arbeid med EMI ved å ta utgangspunkt i det mellomste formatet fordi det gav best resultater for alle stoffene. Sammenligninger mellom ekstraksjoner utført med EMI og LPME viser at systemet vesentlig raskere kommer til likevekt ved EMI. Resultatene viser også at størrelsen på vialen til donorfase er av betydning da det ble forskjell i utbytter ved ulike vialstørrelser.

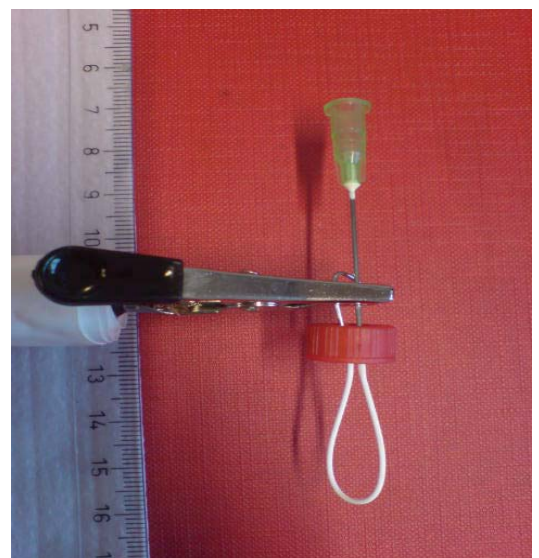
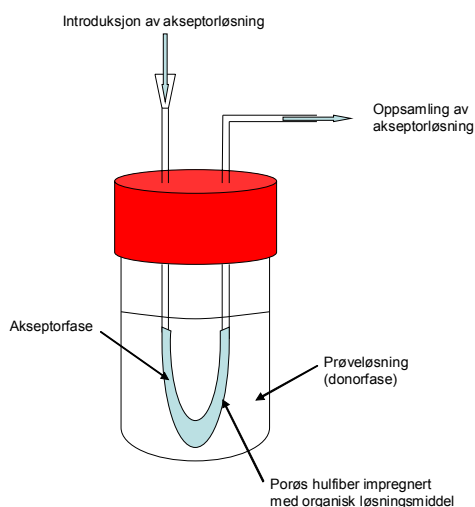
3.3 Hulfiber

3.3.1 Ulike fibertyper

Hulfiberen spiller en sentral rolle i LPME og vil dermed også gjøre det i EMI. Den organiske fasen immobiliseres i hulfiberens vegger, og hulfiberens lumen fungerer som reservoar for akseptorfase. Det ble testet ut ulike fibertyper for å se om de ulike typene gav forskjell i ekstraksjonsutbytter. En polysulfon hulfiber med i.d 1,6 mm ble forsøkt, men ved injisering av akseptorfase åpnet fiberen seg i motsatt ende slik at akseptorfase ble presset ut. Det ble derfor ikke gjort noen ekstraksjoner med denne fiberen. En polyetersulfon hulfiber med i.d. 1,5 mm ble deretter forsøkt. Det var ingen tekniske problemer under ekstraksjonen med denne, men ekstraksjonsutbyttene var vesentlig lavere enn ved bruk av standardfiber og det ble derfor ikke gjort flere forsøk med denne fibertypen. Haloperidol hadde et utbytte på ca 4,5 % etter 5 minutters ekstraksjonstid.

3.3.2 Loop-fiber

En siste fibertype som ble forsøkt var en polypropylenfiber med i.d på 600 μm . Fiberlengden ble økt til 6 cm slik at et volum på 30 μL akseptorfase fikk plass i fiberens lumen. Fiberen ble festet til enden av to sprøytespisser som fungerte som guiding tubes. Det ble festet en katode direkte på sprøytespissene slik at disse fungerte som elektrode. Se figur 9 og bilde 1.



Figur 9, bilde 1. Polypropylenfiber 600 μm i.d.festet som loop til 2 sprøytespisser

Utbyttene ble høyere ved bruk av denne fibertypen sammenlignet med standardfiberen, se tabell 2. Grunnen til at utbyttene økte ved bruk av denne fibertypen kan være at fiberens kontaktflate med donorfasen ble større, eller at strømkilden ble koblet direkte til sprøytespissene og at disse fungerte som elektrode.

Tabell 2. Ekstraksjonsutbytter av loop-fiber og standardfiber.

	EKSTRAKSJONSUTBYTTE, %, (RSD)				
	Loperamid	Haloperidol	Metadon	Nortriptylin	Petidin
Loopfiber, 600µm i.d	92,4 (10,5)	88,9 (3,3)	108,5 (4,7)	85,5 (5,0)	59,4 (15,5)
Standard, 1,2 µm i.d	57,2 (8,8)	31,6 (5,5)	68,0 (7,6)	36,2 (9,0)	21,8 (15,4)

Loop-fiberen gav såpass bra resultater at det ble bestemt å fortsette bruken av denne fibertypen i noen flere forsøk. Dette var forsøk som omhandlet fornyelse av akseptorfase underveis i ekstraksjonen og står beskrevet under kapittel 3.4.4.

3.3.3 Loop-fiber kombinert med magnetrører

Med tanke på bruk av loop-fiberen i videre forsøk ble vibrasjonmikseren (1000 rpm) forsøkt erstattet med magnetrører (runde hastighet ikke oppgitt). Det ble ansett som mer stabilt for oppsettet hvis en magnetrører kunne erstatte vibrasjonmikseren, fordi en av svakhetene med loop-fiberen var at hulfiberen i enkelte tilfeller løsnet fra sprøytespissene under ekstraksjonen som følge av den kraftige vibreringen. Vibrasjonmikseren ble erstattet av magnetrører og foruten om dette ble forsøkene (n=6) utført etter standardoppsettet. Magnetrøreren gav dårligere utbytter enn vibrasjonmikseren og det ble derfor ikke gjort flere forsøk med magnetrører.

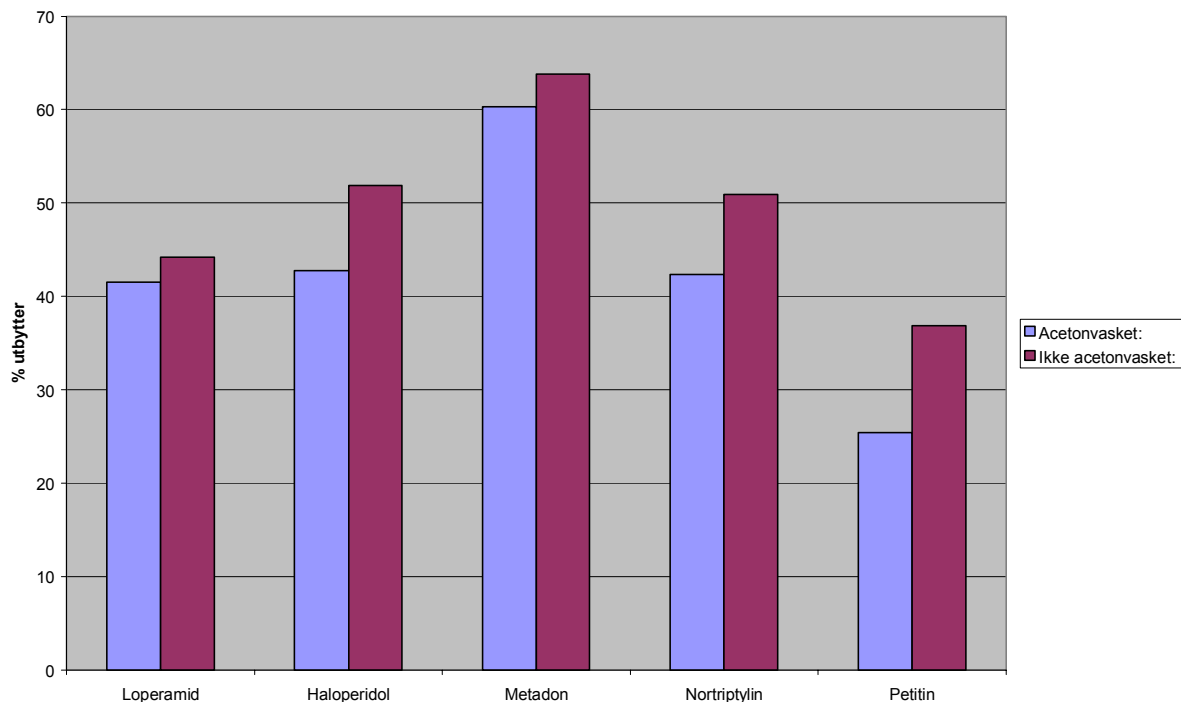
3.3.4 Gjenbruk av hulfiber

Det ble kjørt forsøk (n=6) med EMI etter vanlige standardbetingelser for å se om fiberen kunne brukes til mer enn *en* ekstraksjon. Etter 5 minutters ekstraksjonstid ble akseptorfase (30 µL) fjernet fra hulfiberen med mikrosprøyte og ny akseptorfase ble injisert i hulfiberen. Fiberen ble så satt inn i en ny prøvevial med ny donorfase. EMI ble utført på vanlig måte i 5

minutter. Resultatene fra forsøket viste at gjenbruk av fiberen gav økte utbytter på opptil 4 %. Dette tyder på at det er en carry-over effekt ved gjenbruk av fiberen, men at det ellers ikke er noen begrensninger på gjenbruk av fiberen. Fordi fiberen er billig, er det i midlertidig liten hensikt med gjenbruk.

3.3.5 Acetonvask av hulfiber

Det siste som ble gjort av forsøk i forbindelse med hulfiberen var fjerning av eventuelle forurensninger i fiberen. Polypropylenfibre kan ha rester av polare grupper på seg etter fabrikasjon. Disse gruppene kan interferere med analytter i prøveløsningen og gi et lavere ekstraksjonsutbytte. Det ble forsøkt å fjerne slike eventuelle forurensninger fra fiberen ved å vaske den med aceton i ultralydbad. Fiberen ble vasket med aceton i to omganger, 20 minutter for hver gang og deretter tørket i romtemperatur. Ekstraksjoner med acetonvasket fiber (n=6) ble sammenlignet med ekstraksjoner utført samme dag med standardfiber som ikke var acetonvasket (n=6). T-test med et konfidensnivå på 95 % viste ingen statistisk signifikant forskjell mellom acetonvasket fiber og ikke-acetonvasket fiber for loperamid, haloperidol, metadon og nortriptylin, mens det for petidin var en statistisk signifikant forskjell som viste at acetonvasket fiber gav dårligere utbytte. Se figur 10.



Figur 10. Prosentvise utbytter av acetonvasket fiber mot ikke-acetonvasket fiber.

3.4 Fornyelse av akseptorfase

Under ekstraksjon med EMI vil konsentrasjonen av analytter i akseptorfase gradvis stige med økende ekstraksjonstid, og en konsentrasjonsgradient vil oppstå mellom høy analyttkonsentrasjon inne i akseptorfase i fiberen, og lav analyttkonsentrasjon i donorfase utenfor fiberen. For å øke ekstraksjonsutbyttene ble det gjort forsøk på å motvirke effekten av konsentrasjonsgradienten ved å fornye akseptorfase underveis i ekstraksjonen.

3.4.1 Innledende forsøk med fornyelse av akseptorfase

De første forsøkene som ble gjort rundt fornyelse av akseptorfase var i standardoppsettet. Ekstraksjoner ble utført etter standardoppsett på vanlig måte, men etter 2,5 minutter ble ekstraksjonen avbrutt (spenning og vibrasjonsmikser ble slått av) og akseptorfase (30 µL) inne i fiberen ble fjernet ved hjelp av en mikrosprøyte og overført til en vial beregnet for analyse i CE. Ny akseptorfase (30 µL) ble injisert i fiberen og ekstraksjonen ble satt i gang i ytterlige 2,5 minutter, slik at samlet ekstraksjonstid totalt ble 5 minutter (n=6). Akseptorfase fra samme fiber etter ekstraksjoner i 2,5 + 2,5 minutter ble samlet i samme prøvevial og analysert i CE. Det ble samme dag utført ekstraksjoner i standardoppsett, 5 minutter, uten fornyelse av akseptorfase (n=6). Disse utgjorde sammenligningsgrunnlag for ekstraksjonene med fornyelse av akseptorfase. Det ble ikke funnet noen signifikante forskjeller mellom utbyttene ved fornyelse av akseptorfase og uten fornyelse av akseptorfase.

3.4.2 Fornyelse av akseptorfase 5+25 minutter

Det var ønskelig å teste videre på om utbyttene kunne økes ved fornyelse av akseptorfase underveis i ekstraksjonen. Det ble derfor gjort flere forsøk på dette området. Det neste som ble forsøkt var å ekstrahere med EMI under standardbetingelser i 5 minutter (n=3). Etter 5 minutter ble akseptorfase (30 µL) fjernet fra fiberen med en mikrosprøyte og ny akseptorfase (30 µL) ble injisert inn i fiberen. Det ble ekstrahert videre i 25 minutter, slik at total ekstraksjonstid ble 5+25 = 30 minutter. Akseptorfase etter de to ekstraksjonsomgangene 5+25 minutter ble samlet sammen i en mikrotube og analysert i CE. Utbyttene etter dette forsøket lå rundt 88-116 %, se tabell 3.

Tabell 3 .Ekstraksjonsutbytter ved fornyelse av akseptorfase sammenlignet med standard ekstraksjon.

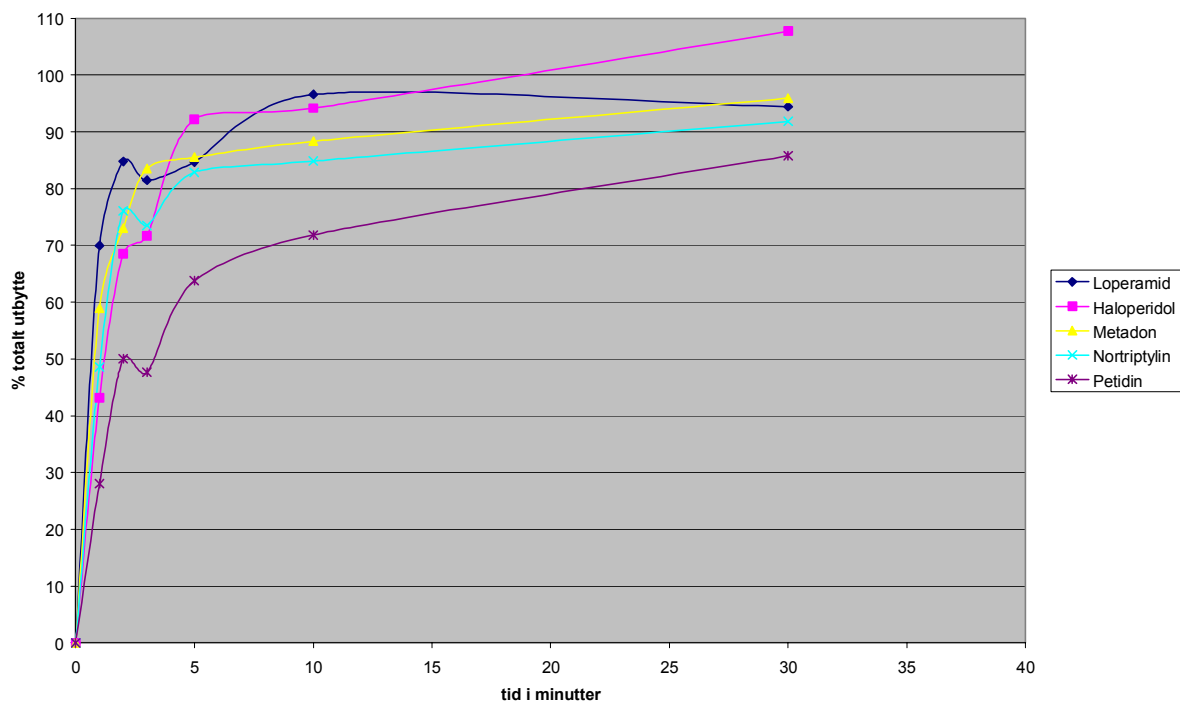
Ekstraksjonstid	Ekstraksjonsutbytte, %, n=3, (RSD)				
	Loperamid	Haloperidol	Metadon	Nortriptylin	Petidin
Fornyelse av akseptorfase, 5+25 min	91,7 (4,6)	107,3 (3,0)	116,5 (6,4)	93,5 (4,6)	88,3 (10,3)
Standard 5 min	55,1 (10,5)	40,7 (14,9)	70,6 (5,2)	43,8 (12,4)	25,8 (20,9)

3.4.3 Tidskurve med fornyelse av akseptorfase

Det ble sett på som interessant å utføre flere forsøk rundt fornyelse av akseptorfase. Det ble bestemt å lage tidskurver for å se hvordan utbyttene endret seg med fornyelse av akseptorfase og økt ekstraksjonstid. Ekstraksjonene ble gjort i 2 trinn. I det første trinnet ble det utført ekstraksjoner ved standardbetingelser i 5 minutter. Akseptorfase (30 µL) ble så fjernet med mikrosprøyte og overført til analyseseal for CE. I trinn 2 ble ny akseptorfase (30 µL) injisert i samme hulfiber som ble brukt i trinn 1, donorfasen var den samme som ved det første ekstraksjonstrinnet, og ekstraksjonen ble satt i gang igjen. Det ble laget tidskurve for trinn 2 ekstraksjonene på tidene 1-2-3-5-10 og 30 minutter, med 3 paralleller på hver tid.

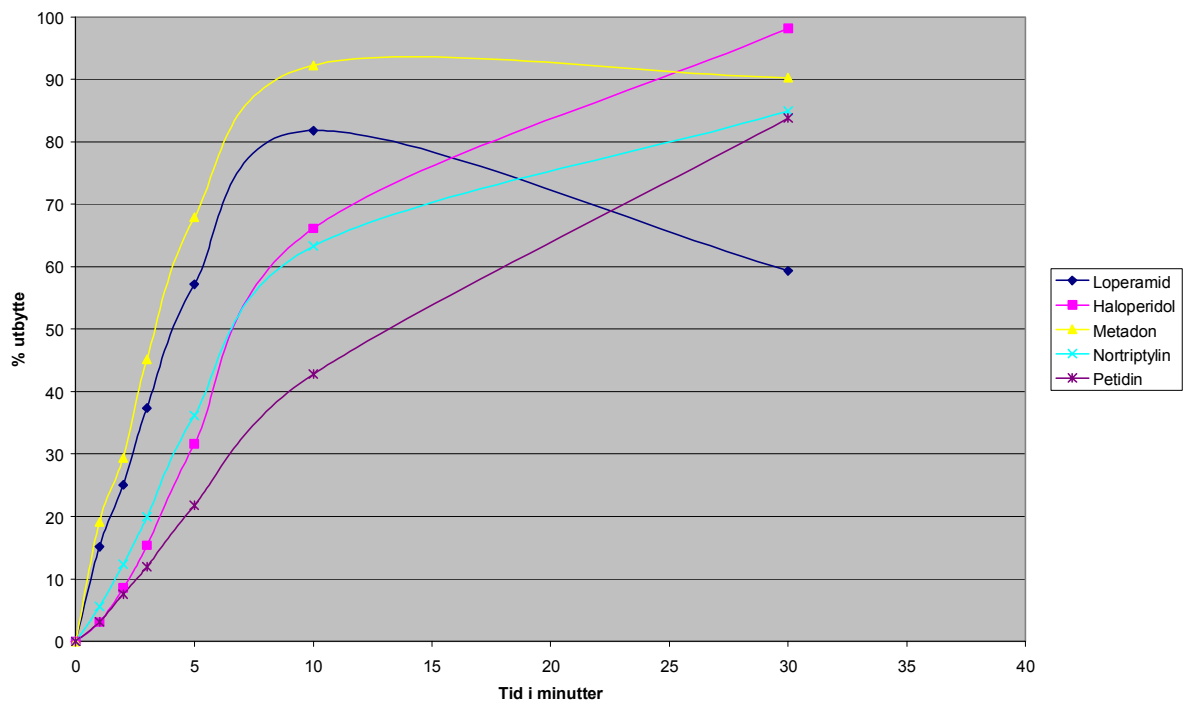
Ekstraksjonsutbyttene for trinn 1 og trinn 2 ble lagt sammen, og figur 11 viser det totale utbyttet for begge ekstraksjonstrinnene.

Etter 5+5 minutter med ekstraksjoner ligger utbyttene på ca 65-90 %. Etter 5+10 minutter med ekstraksjoner ligger utbyttene på ca 70-90 %. Ytterligere økning av ekstraksjonstid ved trinn 2 ekstraksjoner gir liten økning av utbyttet for de fleste stoffer. For petidin øker utbyttet fra ca 70 % til 85 % i løpet av de siste 20 minuttene med ekstraksjon



Figur 11. Totalt ekstraksjonsutbytte som funksjon av tiden, trinn 1+trinn 2 ekstraksjoner, tidskurve..

Figur 12 viser til sammenligning en tidskurve utført etter vanlige standardbetingelser, uten fornyelse av akseptorfase underveis i ekstraksjonen. I denne tidskurven kan det sees at utbyttene til petidin lå rundt 45 % prosent etter 10 minutters ekstraksjonstid. I tidskurven over, figur 11 med fornyelse av akseptorfase, lå utbyttet for petidin rundt 65 % etter 5+5 minutter, altså ca 20 % mer enn for ekstraksjon i 10 minutter uten fornyelse av akseptorfase.



Figur 12. Ekstraksjonsutbytte som funksjon av tiden, tidskurve.

3.4.4 Flow

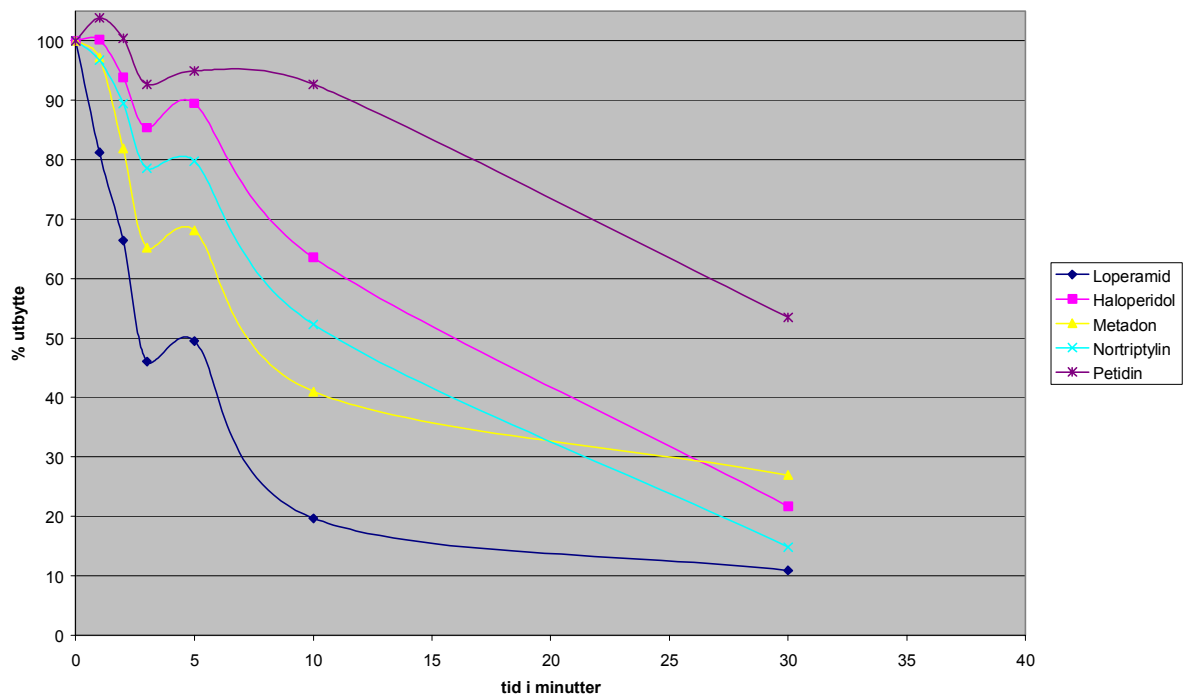
Det siste som ble forsøkt med fornyelse av akseptorfase var en kontinuerlig fornyelse av akseptorfase underveis i ekstraksjonen. Forsøkene ble gjort med loop-fiberen beskrevet i kapittel 3.3.2. koblet til en dilutor-dispenser. Dilutor-dispenseren (en pumpe) sørget for en jevn flyt av akseptorfase igjennom fiberen mens ekstraksjonen pågikk. Det var en del tekniske vanskeligheter med å få dette til å fungere, og det systemet som ble utviklet var for svakt til å kunne gi pålitelige resultater. Etter en del forsøk ble dette arbeidet avsluttet.

3.5 Analyse av donorfase og akseptorfase

Etter at det var gjort en del forsøk rundt fornyelse av akseptorfase underveis i ekstraksjonen var det ønskelig å undersøke hvordan konsentrasjonen av legemidlene minket i donorfase ettersom ekstraksjonstiden med EMI økte. Det ble bestemt å utføre tidskurver etter standardbetingelser på tidene 1-2-3-5-10 og 30 minutter, med 3 paralleller på hver tid. For å kunne beregne hvor analyttene befant seg til enhver tid måtte både akseptorfase og donorfase analyseres etter ekstraksjon i CE.

3.5.1 Konsentrasjon av analytter i donorfase

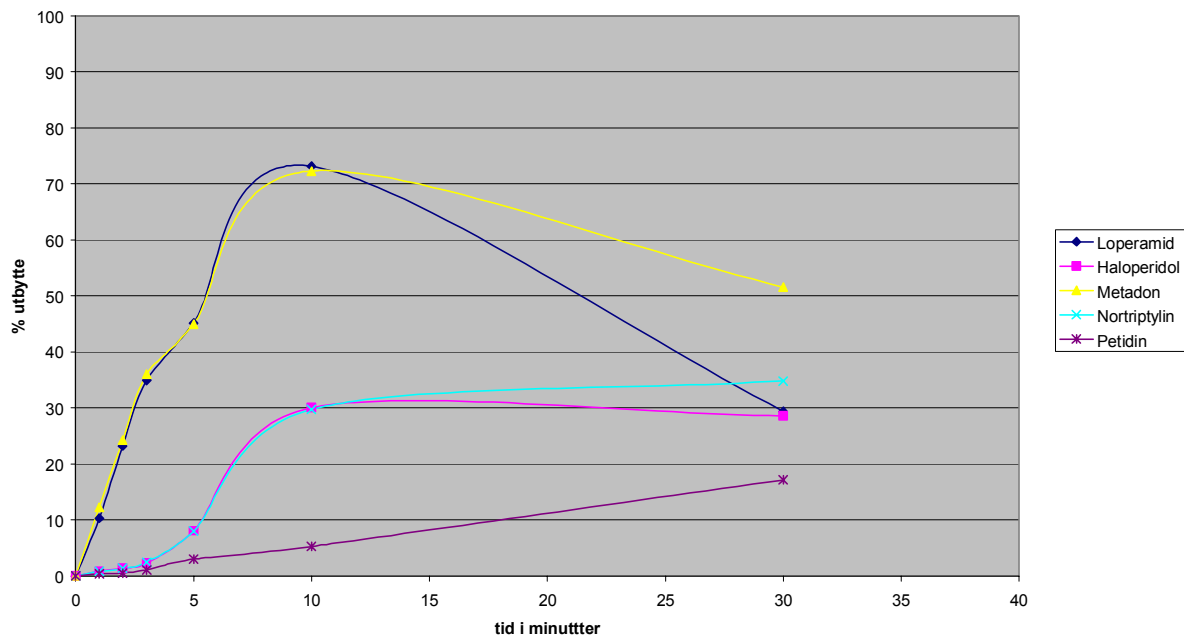
Det ble antatt at analyttkonsentrasjonen i donorfasen ville avta såpass mye ettersom ekstraksjonstiden økte, at CE-apparatet ville være uegnet for analyse (for lav følsomhet) hvis konsentrasjonen i donorfase var $1\mu\text{g/mL}$ (standardkonsentrasjonen). Derfor ble konsentrasjonen i donorfase økt 10 ganger til $10\mu\text{g/mL}$ før ekstraksjonene ble satt i gang. Både akseptorfase og donorfase ble analysert i CE etter endt ekstraksjon, og det ble satt tidskurver som viser hvordan analyttkonsentrasjonen endret seg i de to fasene ettersom ekstraksjonstiden økte. Tidskurven for donorfase viser som forventet en nedgang i konsentrasjon av legemiddelanalytter med økende ekstraksjonstid, se figur 13.



Figur 13. Analyttkonsentrasjon i donorfase som funksjon av økende ekstraksjonstid.

3.5.2 Konsentrasjon av analytter i akseptorfase

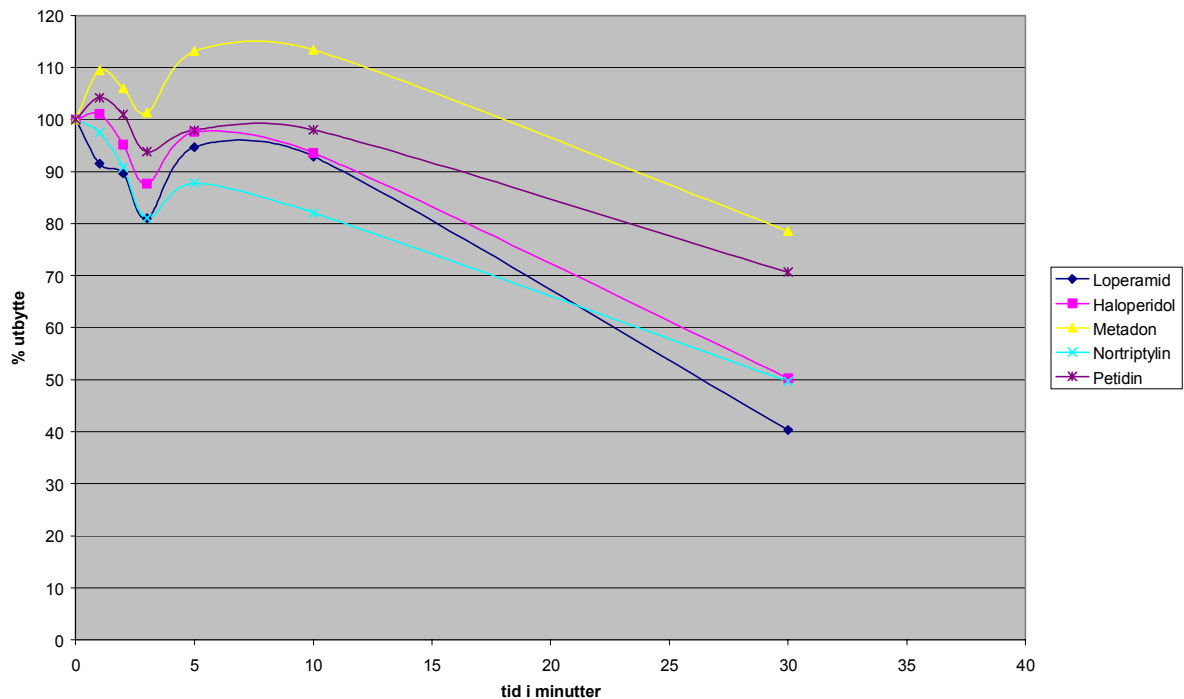
Figur 14 viser tidskurve for akseptorfase etter ekstraksjon fra donorfase med utgangskonsentrasjon 10 µg/mL. Som det kan sees av figuren viser denne tidskurven en annen trend enn tidligere tidskurver (figur 12) i oppgaven. Utbyttet til loperamid og metadon var ca 75 % etter 10 minutters ekstraksjonstid og ble redusert til henholdsvis 30 % og 50 % ved endt ekstraksjonstid (30 minutter). Haloperidol og nortriptylin har utbytter på kun ca 30 % etter 10 minutters ekstraksjon, mens petidin hadde et utbytte på under 10 % etter 10 minutters ekstraksjon. Disse noe uvanlige ekstraksjonsutbyttene kan tyde på en overbelastning av systemet når utgangskonsentrasjon i organisk fase ble økt til 10 µg/mL.



Figur 14. Ekstraksjonsutbytter som funksjon av tid for akseptorfase.

3.5.3 Total mengde detektert legemiddel

Figur 15 viser den totale analyttkonsentrasjon i donorfase og akseptorfase. Noe overraskende viser denne figuren at ettersom ekstraksjonstiden øker minsker den totale analyttkonsentrasjonen i donorfase og akseptorfase. Det vil si at det med økende ekstraksjonstid vil trappes en økende mengde analytt i den organiske fasen.



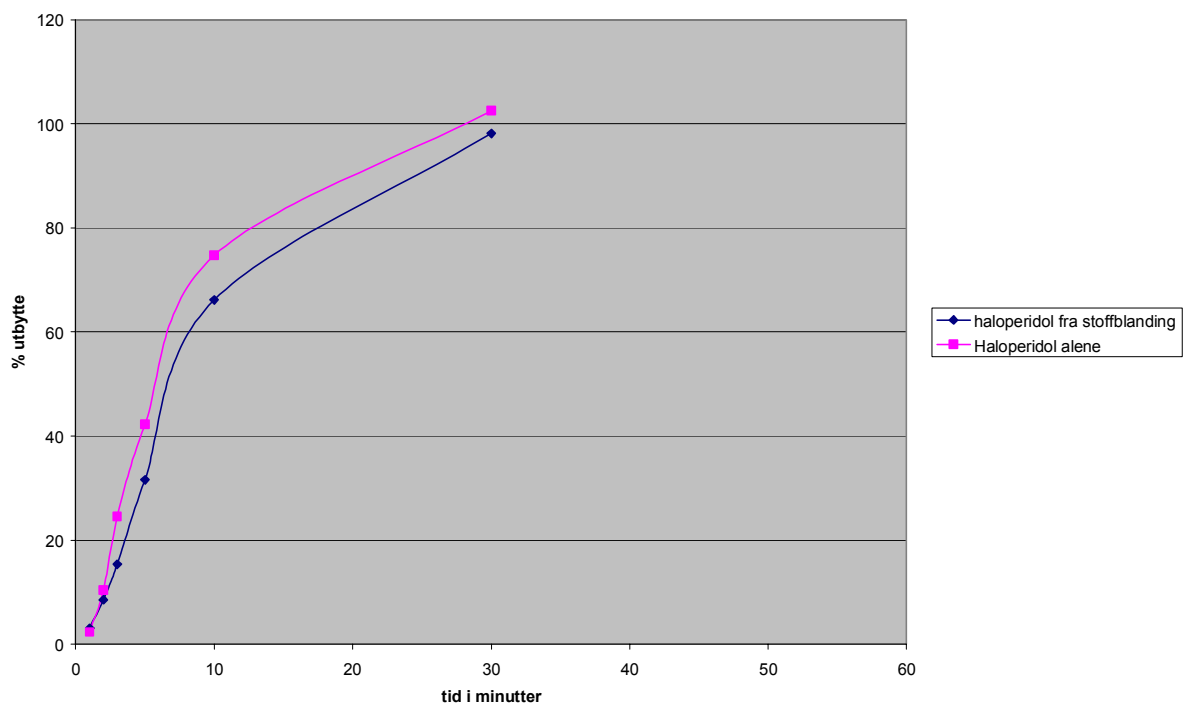
Figur 15. Total mengde detektert legemiddel i donor og akseptorfase som funksjon av tiden.

Ekstraksjonene som ble gjort med den 10-doblete analyttkonsentrasjonen i donorfase viste som nevnt nedgang i utbytter for loperamid og metadon ved 30 minutters ekstraksjon etter at de hadde hatt høye utbytter ved 10 minutter. Denne tendensen har ikke blitt observert ved noen av de andre tidskurvene som har blitt utført i forbindelse med dette arbeidet. Nedgangen tyder på en tilbakeekstraksjon fra akseptorfase når konsentrasjonen der har blitt for høy. Haloperidol har normalt sett hatt høyere utbytte ved tidskurver fra donorfase med konsentrasjon 1 $\mu\text{g/mL}$, 65 % ved ti minutter, mot 30 % maksimalt i tidskurven med høy analyttkonsentrasjon.

3.5.4 Intern påvirkning mellom legemidler under ekstraksjon

Det ble gjort forsøk for å se om legemidlene i donorfasen kunne ha en intern påvirkning på hverandre. Det kan tenkes at ekstraksjonen av ett legemiddel kan påvirkes av tilstedeværelsen av andre legemidler i donorfasen, og at ekstraksjonsutbyttet for et legemiddel i donorfase alene uten tilstedeværelse av andre stoffer, kan gi høyere utbytte. Haloperidol ble valgt som modellsubstans, og det ble laget donorløsning med haloperidol 1 µg/mL. Donorfasen med haloperidol ble ekstrahert ved standardbetingelser, og det ble laget en tidskurve.

Ekstraksjonene ble utført på tidene 1-2-3-5-10 og 30 minutter, med tre paralleller på hver tid (n=3). Det ble også samme dag laget en lik tidskurve med alle fem modellsubstanser som sammenligningsgrunnlag for tidskurven med haloperidol. Ved sammenligning av tidskurvene kom det fram at det ikke var noen vesentlig endring av utbyttene av haloperidol i de to tidskurvene, se figur 16.

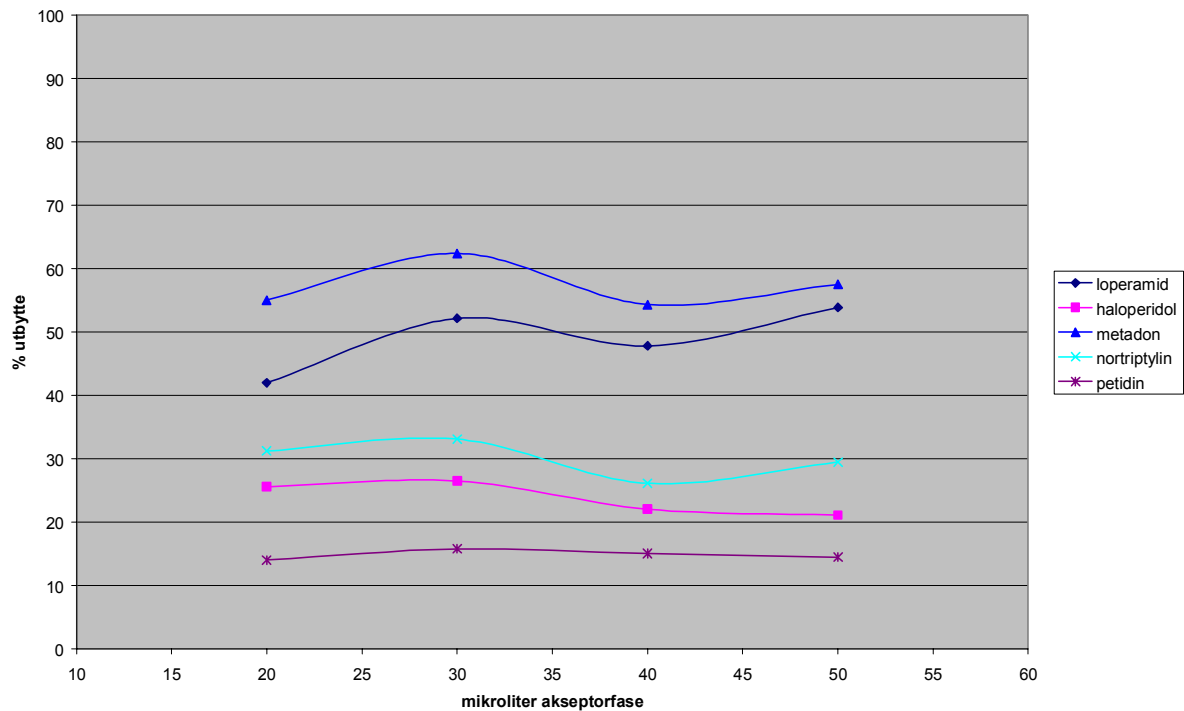


Figur16. Ekstraksjonsutbytte for haloperidol alene i donorfase og haloperidol sammen med de andre analyttene i donorfase, som funksjon av tiden.

3.6 Volumendringer av akseptorfase og donorfase

3.6.1 Volumendringer av akseptorfase

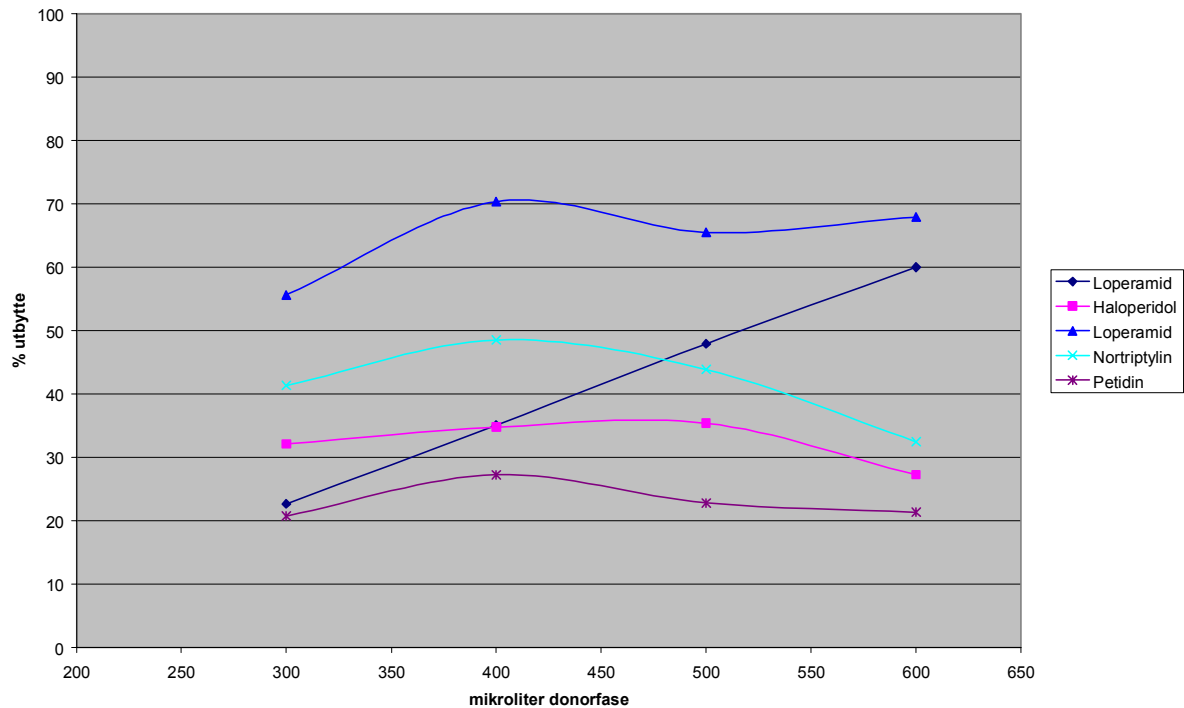
Forsøk med fornyelse av akseptorfase gav som tidligere vist i oppgaven økte utbytter, sannsynligvis fordi effekten av konsentrasjonsgradienten ble motvirket når akseptorfase ble byttet ut underveis i ekstraksjonen. Med bakgrunn i dette ble det sett på som interessant å gjøre forsøk med økte volummengder akseptorfase inne i fiberen. Det ble gjort 3 paralleller på hvert av volumene 20 μL , 30 μL , 40 μL og 50 μL . Foruten endringer i volum av akseptorfase, ble forsøkene gjort etter standardoppsett med standardbetingelser. Som det kan sees av figur 17 gav volumendringer av akseptorfase ingen endringer i utbyttene.



Figur 17. Ekstraksjonsutbytter ved ulike volumer av akseptorfase.

3.6.2 Volumendringer av donorfase

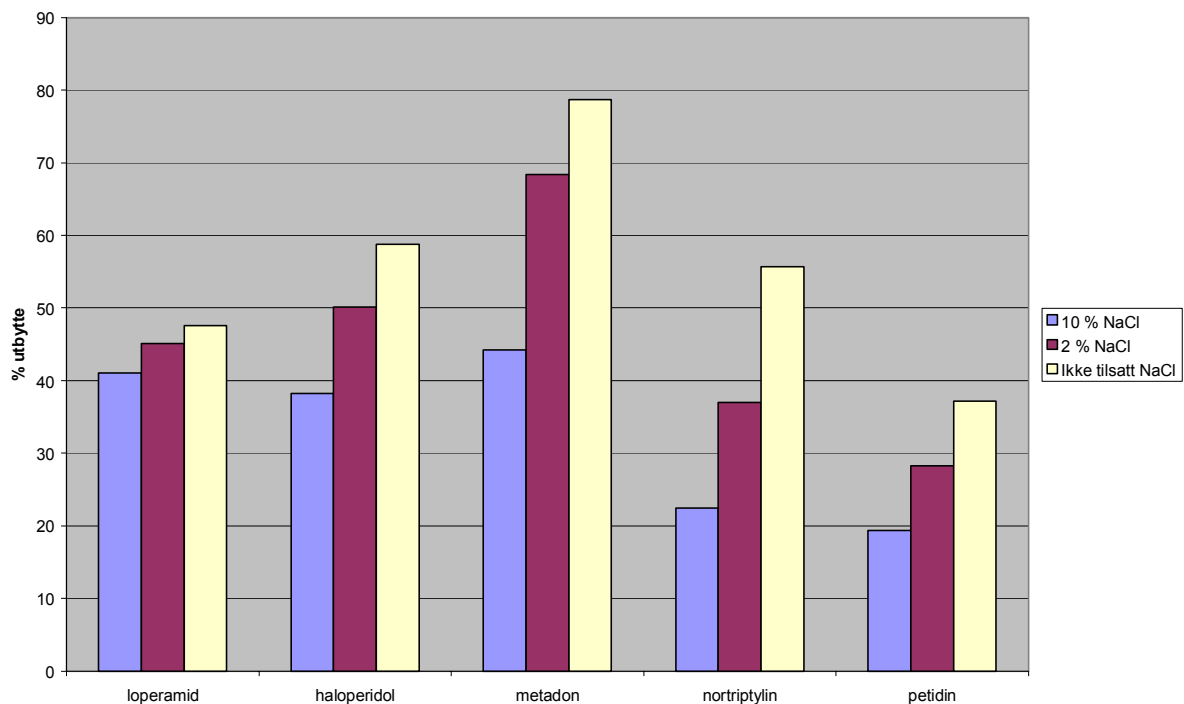
Det ble også gjort forsøk med volumendringer av donorfase. Fyllingsgraden til donorfase vil øke i prøvevialen ved økte volumer, og kontaktflaten mellom donorfase og hulfiber vil også øke. Det ble gjort forsøk med ulike volum av donorfase for å undersøke effekten av dette. Forsøkene ble gjort i standardoppsett med EMI. Volumendringene ble gjort ved å tilsette ulike mengder destillert vann til prøvevialen med donorfase. Det ble utført 3 paralleller ved hvert volum. Opprinnelig var det 300 μL donorfase i prøvevialen. Til dette ble ulike mengder destillert vann tilsatt, så totalvolumene ble 300 μL (0 μL tilsatt), 400 μL (100 μL tilsatt), 500 μL (200 μL tilsatt) og 600 μL (300 μL tilsatt). Som det kan sees av figur 18 hadde volumendringene liten effekt på økning av utbyttene.



Figur18. Ekstraksjonsutbytter ved økende volum av donorfase.

3.6.3 Endring av polaritet i donorfase

Ved å endre polariteten på donorfase vil legemidlenes løselighet i fasen endre seg. Tilsetning av NaCl vil føre til økt polaritet i donorfase, og gi dårligere løselighet av legemidlene fordi de har en relativt stor hydrofob del. Det ble laget 0 %, 2 % og 10 % saltløsninger ved å tilsette NaCl til donorfase. T-test med 95 % -konfidensnivå viste ingen statistisk signifikante forskjeller bortsett fra for nortriptylin. For nortriptylin gav 2 % og 10 % saltløsninger dårligere utbytter sammenlignet med 0 % saltløsning. Se figur 19.



Figur 19. Utbytter i ulike mengder tilsatt NaCl.

4 Konklusjon

Hensikten med denne oppgaven var å gjøre undersøkelser rundt det tekniske formatet i et ønske om å øke ekstraksjonsutbyttene. En del endringer har vært forsøkt, uten å gi de helt store resultater. EMI har fra starten blitt satt opp med de tekniske parametere som fra før av har vist seg som mest gunstige i LPME. På grunn av dette var det ikke uventet at standardformatet som det i denne oppgaven ble jobbet ut i fra, er et godt format.

Sammenligningen av de 3 ulike størrelsesformatene som ble gjort i de første forsøkene, viste at stoffene som ble ekstrahert oppførte seg ulikt i EMI og LPME. I EMI kom ekstraksjonene vesentlig raskere til likevekt sammenlignet med LPME. Tidligere forsøk gjort med en spenning på 300 V har vist at optimal ekstraksjonstid for EMI er 5 minutter. I dette arbeidet var spenningskilden som ble brukt 15 V og det måtte da ekstraheres i 10 minutter før ekstraksjonen kom til likevekt. Dette tyder på at hastigheten på migrasjonen er spenningsavhengig. I tiden som kommer bør det gjøres flere forsøk for å finne den optimale spenningen for ekstraksjonsmetoden.

Det bør også gjøres forsøk med kontinuerlig flow av akseptorfase igjennom loop-fiberen samtidig som ekstraksjon pågår. Forsøkene med loop-fiberen og forsøkene med fornyelse av akseptorfase viste tendenser til økte utbytter, sannsynligvis fordi konsentrasjonsgradienten i akseptorfase ble mindre og fordi kontaktflaten med donorfasen til loop-fiberen var større enn fiberen i standardformatet.

Utviklingen av EMI som ekstraksjonsmetode ligger fortsatt i startfasen. Designet som ble benyttet i denne oppgaven har vist seg å fungere bra, men mye forskning gjenstår for å finne de optimale betingelsene for EMI som ekstraksjonsmetode.

5 Referanseliste

1. Rasmussen, K.E., et al., *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*. Journal of Chromatography A, 2000. **873**(1): p. 3-11.
2. Psillakis, E. and N. Kalogerakis, *Developments in liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(9): p. 565-574.
3. Krogh, M., et al., *Solid-phase microextraction for the determination of the free concentration of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1995. **673**(2): p. 299-305.
4. Ho, T.S., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction: Comparison with conventional liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 3-17.
5. Gronhaug Halvorsen, T., S. Pedersen-Bjergaard, and K.E. Rasmussen, *Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001. **760**(2): p. 219-226.
6. Rasmussen, K.E. and S. Pedersen-Bjergaard, *Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(1): p. 1-10.
7. Ho, T.S., et al., *Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport*. Journal of Chromatography A, 2003. **998**(1-2): p. 61-72.
8. Andersen, S., et al., *Liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis, a promising tool for the determination of chiral drugs in biological matrices*. Journal of Chromatography A, 2002. **963**(1-2): p. 303-312.
9. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs*. Electrophoresis 2000, 2000. **21**: p. 579-585.
10. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B, 2005. **817**(1): p. 3-12.
11. Levine, M.L. and M. Bier, *Electrophoretic transport of solutes in aqueous two-phase systems*. Electrophoresis, 1990. **11**(8): p. 605-611.
12. Marando, M.A. and W.M. Clark, *Two-phase electrophoresis of proteins*. Separation Science and Technology, 1993. **28**(8): p. 1561-1577.
13. Oehler, R.D. and W.M. Clark, *[beta]-Lactamase recovery from E. coli cell lysate via two-phase electrophoresis*. Biotechnology Progress. **12**(6): p. 873-876.
14. Zhai, S.L., G.S. Luo, and J.G. Liu, *Selective recovery of amino acids by aqueous two-phase electrophoresis*. Chemical Engineering Journal, 2001. **83**(1): p. 55-59.
15. Stichlmair, J., J. Schmidt, and R. Proplesch, *Electroextraction: A novel separation technique*. Chemical Engineering Science, 1992. **47**(12): p. 3015-3022.
16. Luo, G.S., et al., *Electroextraction separation of dyestuffs*. Separation Science and Technology, 1999. **34**(5): p. 781-791.
17. Luo, G.S., et al., *Two-phase electrophoresis separation of dyestuffs from dilute solution*. Chemical Engineering Journal, 1999. **73**(2): p. 137-141.
18. Luo, G.S. and F.Y. Wu, *Concentration of formic acid solution by electro-electrodialysis*. Separation Science and Technology, 2000. **35**(15): p. 2485-2496.

19. Luo, G.S., et al., *Liquid-liquid phase equilibrium under external electric fields*. Separation Science and Technology, 2001. **36**(12): p. 2799-2809.
20. Pan, S., et al., *Back-extraction of carboxylic acids by two-phase electrophoresis*. Separation Science and Technology, 2003. **38**(15): p. 3731-3746.
21. Luo, G.S., et al., *Two-Phase Electro-Electrodialysis with an Emulsion as Anolyte*. Separation Science and Technology, 2004. **39**(6): p. 1267-1278.
22. Luo, G.S., et al., *Two-phase electro-electrodialysis for recovery and concentration of citric acid*. Separation and Purification Technology, 2004. **38**(3): p. 265-271.
23. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1-2): p. 29-34.
24. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**(2): p. 183-190.