

HOVEDFAGSOPPGAVE I LEGEMIDDELANALYSE FOR GRADEN CAND.PHARM

Elektromembranekstraksjon ved lav spenning

- Utvikling og optimalisering av organiske membraner

Inger Johanne Østegaard Kjelsen



Faggruppen for Legemiddelanalyse,
Avdeling for Farmasøytisk Kjemi,
Farmasøytisk Institutt,
Det matematisk-naturvitenskapelige Fakultet,
Universitetet i Oslo

Høst 2007

Elektromembranekstraksjon ved lav spenning

– Utvikling og optimalisering av organiske membraner

Inger Johanne Østegaard Kjelsen

Hovedfagsoppgaven ble gjennomført ved Faggruppen for Legemiddelanalyse, Avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo, i perioden november 2006 til september 2007.

Veiledere:

Professor Stig Pedersen – Bjergaard

Professor Knut Einar Rasmussen

Stipendiat Astrid Gjelstad

FORORD

Jeg vil takke min hovedveileder Stig Pedersen – Bjergaard for utmerket oppfølging underveis. Takk for at du alltid har hatt tid når jeg har lurt på noe, og takk for gode tilbakemeldinger på arbeidet jeg har utført.

Mine 2 andre veiledere, professor Knut Einar Rasmussen og stipendiat Astrid Gjelstad, fortjener også en god takk for oppmuntring og innspill underveis. En ekstra takk til Astrid for all praktisk hjelp, artige sammenkomster og, ikke minst, drops.

En stor takk til Torunn for mye humor gjennom hele studiet og særlig det siste året; faglig, ufaglig, usaklig og bryllupsaktig. Mads og Thien: Dere har vært ypperlige kontorkamerater.

Til slutt, Erlend, takk for at du har vært der når jeg har kommet hjem, og for all uunnværlig støtte og tålmodighet underveis.

Oslo, september 2007

Inger Johanne Østegaard Kjelsen

INNHALDSFORTEGNELSE

1	Forkortelser.....	6
2	Sammendrag.....	8
3	Introduksjon.....	9
4	Teori.....	13
5	Eksperimentelt.....	18
5.1	Karakteristikk av modellsubstansene	18
5.2	Utstyr og betingelser for elektromembranekstraksjon	20
5.3	Biologiske prøver.....	21
5.4	Bestemmelse av modellsubstansenes fordelingskoeffisient i ulike organiske faser	22
5.5	Betingelser for kapillærelektroforese.....	22
5.6	Kjemikalier	23
5.7	Standarder og prøveløsninger	24
5.8	Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor	25
5.9	F – test	25
6	Resultater og diskusjon.....	27
6.1	Utvelgelse av prøveformat.....	27
6.2	Utvikling av nye membraner og optimalisering av disse	28
6.2.1	Screening av organiske faser.....	28
6.2.2	Modellsubstansenes fordelingskoeffisienter	32
6.2.3	Spenningskurver.....	34
6.2.4	Tilsetning av ulike ionepardannere til den organiske fasen.....	37
6.2.5	Tilsetning av ulike konsentrasjoner av sulfonsyrer til den organiske fasen	41
6.2.6	Tilsetning av nonansulfonsyre til ulike deler av ekstraksjonsenheten	42
6.2.7	Endring av ionebalansen	43
6.2.8	Effekt av endring i ekstraksjonstid.....	44
6.2.9	Batterier som spenningskilde.....	48
6.2.10	Endres pH i donor- og akseptorfasene som følge av elektrodereaksjonene? ..	50
6.2.11	Utbytte og oppkonsentreringsfaktor under optimale betingelser.....	51
6.2.12	Linearitet.....	52
6.2.13	Linearitet ved endret ionebalanse.....	55
6.3	Biologiske prøver.....	56
6.3.1	Plasmaprøver	56
6.3.1.1	Overskridelse av bufferkapasitet i plasma	57
6.3.1.2	Felling av proteiner i plasma.....	59
6.3.1.3	Plasma fra ulike pasienter.....	61
6.3.1.4	Linearitet i plasmaprøver	62
6.3.2	Urinprøver	64
6.3.2.1	Ulike fortyninger og ionebalanse	64
6.3.2.2	Urin fra ulike personer og ulike tidspunkt	66
6.3.2.3	Linearitet i urin	67

6.3.3	Morsmelk	69
7	Konklusjon	73
8	Referanser	75

1 FORKORTELSER

μA	Mikroampere
μAU	Mikroabsorbansenheter
μg	Mikrogram
μL	Mikroliter
BNPE	Benzyl-2-nitrofenyleter
CAPSO	3-(sykloheksylamino)-2-hydroksy-1-propansulfonsyre
CE	Kapillærelektroforese
cm	Centimeter
DNPE	Dodecyl-2-nitrofenyleter
E	Oppkonsentreringsfaktor
EME	Elektromembranekstraksjon
EMI	Elektromembranisolasjon
ENB	1-etyl-2-nitrobenzen
HCl	Saltsyre
i.d	Indre diameter
IPNB	1-isopropyl-4-nitrobenzen
kV	Kilovolt
LPME	Væskefase mikroekstraksjon (Liquid Phase Micro Extraction)
MeOH	Metanol
mg	Milligram
mL	Milliliter
mM	Millimolar
NB	Nitrobenzen
NDPE	2-nitrodifenyleter
nm	Nanometer
NPE	Nitropentan

NPOE	2-nitrofenyloktyleter
NPR	1-nitropropan
psi	Pounds per square inch (1 psi = 68,93 mbar = 6,893 x 10 ³ Pa)
R	Utbytte/recovery
Rpm	Runder per minutt (ristehastighet)
RSD	Relativt standardavvik
s	Sekunder
UV	Ultrafiolett
V	Volt

2 SAMMENDRAG

Det er for første gang utviklet organiske membraner til bruk ved elektromembranekstraksjon (EME) ved lave spenninger. Ekstraksjonene ble utført ved at basiske modellsubstanser ble ekstrahert fra en vandig sur donorfase (1 mL) gjennom en organisk fase immobilisert i porene på en hulfiber og til en vandig sur akseptorfase (25 µL). Ekstraksjonen ble drevet av en påsatt spenning mellom elektroder i donor- og akseptorfase. Det ble utført forsøk med henblikk på å undersøke hvilke effekter ulike organiske faser, ulike tilsetninger til den organiske fasen, endret ekstraksjonstid og spenning samt ulik ionebalanse hadde på ekstraksjonsutbyttene.

Optimale betingelser ble oppnådd ved å bruke 1-isopropyl-4-nitrobenzen (IPNB) som organisk fase, pH 2 i de vandige fasene, 10 V som påsatt spenning og 5 minutters ekstraksjonstid. Det ble undersøkt om det var en lineær sammenheng mellom konsentrasjon av modellsubstans i donor- og akseptorfase. Linearitet ble vist i konsentrasjonsområdet 0,250 – 2,5 µg/mL.

For første gang ble det utført systematiske lav – spennings EME på biologiske prøver. EME fungerte godt som prøveoppbeidelse på plasma, urin og morsmelk, og var en selektiv metode for oppkonsentrering av modellsubstanser og samtidig som det var en god metode for å ekskludere interfererende endogene substanser fra de ulike prøvematriksene. Metoden var ikke sensitiv for individuelle variasjoner i biologiske prøver fra ulike personer. Det ble vist linearitet i både plasma og urin i konsentrasjonsområdet 0,250 – 2,5 µg/mL.

3 INTRODUKSJON

Væskefase mikroekstraksjon (Liquid Phase Microextraction; LPME) er en metode for prøveopparbeidelse i farmasøytisk bioanalyse som det er gjort svært mye forskning på. Utviklingen av metoden har gått fra ekstraksjon i en 0,5 – 8 μL dråpe organisk løsemiddel hengende på tuppen av en mikrosprøyte [1] til ekstraksjon gjennom en hulfiber immobilisert med organisk løsemiddel [2-5].

Ekstraksjon gjennom en dråpe organisk løsemiddel blir utført ved at det trekkes opp en gitt mengde organisk løsemiddel med en mikrosprøyte, som deretter presses ut igjen til en dråpe som henger fast i tuppen på sprøyten. Mikrosprøyten med dråpen settes ned i en vandig donorfase som inneholder de substansene man ønsker å ekstrahere, og et røreverk (f. eks magnetrører) slik at det blir konveksjon i den vandige donorfasen. Ekstraksjonen skjer ved at substansene får en fordeling inn i den organiske dråpen som følge av passiv diffusjon basert på substansens fordelingskoeffisient. Etter en gitt ekstraksjonstid trekkes dråpen inn igjen i mikrosprøyten og tas opp av den vandige løsningen. Deretter overføres dråpen til f. eks gasskromatografisk analyse for kvantifisering av ekstraherte substanser [1].

LPME gjennom en hulfiber utføres ved at en hul fiber med porøse vegger dyppes i et organisk løsemiddel. Det organiske løsemiddelet fyller da alle porene i veggene og holdes fast ved hjelp av kapillærkrefter. Man får en da hulfiber med organisk løsemiddel immobilisert i veggen samtidig som hulrommet (lumen) inne i fiberen ikke er fylt. Hulfiberen med immobilisert organisk løsemiddel betegnes som den organiske fasen i LPME. Lumen kan deretter fylles opp med akseptorfase, som kan være enten mer organisk løsemiddel eller en vandig løsning. Når fiberen settes ned i en vandig løsning kan substanser ekstraheres inn i den organiske fasen. Fra den organiske fasen kan substansene ekstraheres videre til akseptorfase i hulfiberlumen.

Hulfiber LPME kan utføres som både 2 – og 3 – fase systemer. 2 – fase systemet består av en vandig donorfase, en organisk fase og en organisk akseptorfase inne i hulfiberlumen. Dette systemet gir en organisk akseptorfase som er direkte kompatibel med gasskromatografisk analyse. I 3 – fase systemet ekstraheres substansene fra den vandige donorfasen gjennom den organiske fasen til en vandig akseptorfase inne i hulfiberen. Ekstraktet fra et 3 – fase LPME system kan brukes direkte videre i væskrokromatografisk eller kapillærelektroforetisk analyse [3, 6].ulfiber LPME har vist seg å være mer robust enn ekstraksjon i en dråpe [7].

Transport av substansene fra donorfase til akseptorfase i LPME er basert på passiv diffusjon. Den passive diffusjonen avhenger blant annet av substansenes fordelingskoeffisient mellom den organiske fasen og donorfasen og mellom den organiske fasen og akseptorfasen [4, 8]. pH i fasene justeres slik at diffusjon av substansene mot akseptorfasen fremmes. For basiske stoffer vil det si at pH gjøres basisk i donorfasen og sur i akseptorfasen. Den porøse hulfiberen, med immobilisert organisk løsemiddel, og basisk pH i donorfasen hindrer at biologiske makromolekyler, syrer samt nøytrale og hydrofile stoffer kan passere, og man får en opprensning av prøven [2-3]. Ekstraksjonen fremmes også av at hele ekstraksjonsenheten settes til risting da dette gir konveksjon i donorfasen og hindrer at det bygges opp et stillestående væskelag mot overflaten til den organiske fasen [8].

I tillegg til en opprensning av prøven får man også en svært god oppkonsentrering av substansene da de ekstraheres fra prøvevolum på 1 – 4 ml til 15 – 25 μ L akseptorfase. Ved 100 % utbytte får man da en oppkonsentreringsfaktor på 66 – 160 [3-4, 6]. Det har nylig blitt publisert en artikkel der det er brukt LPME til å analysere legemiddelrester i avløpsvann. Med ekstraksjon fra 1100 mL donorfase til 20 μ L akseptorfase har man oppnådd oppkonsentreringsfaktorer opp til 27 000 [9].

Videre forskning har utviklet LPME ytterligere og i 2005 ble en ny variant lansert: elektromembranekstraksjon (EME), også kjent som elektromembranisolasjon (EMI). Membranen navnet henviser til er hulfiberen med immobilisert organisk fase (løsemiddel), og som tidligere har blitt omtalt som "supported liquid membrane" [8]. EME er som et 3 – fase LPME system men med en påsatt spenning som driver transporten av substans fra donor- til akseptorfase. Den påsatte spenningen går gjennom en elektrode i donorfasen til en elektrode i akseptorfase, og med en pH i fasene som er justert slik at substansene foreligger på ionisert form, får man en migrasjon av ladede substanser mot den motsatt ladede elektroden [10]. Bruk av spenning som drivkraft over den organiske membranen har kortet ned ekstraksjonstiden betydelig. For en gruppe av 5 basiske legemidler har ekstraksjonstiden med EME vært opptil 17 ganger kortere enn tilsvarende ekstraksjon med LPME [8].

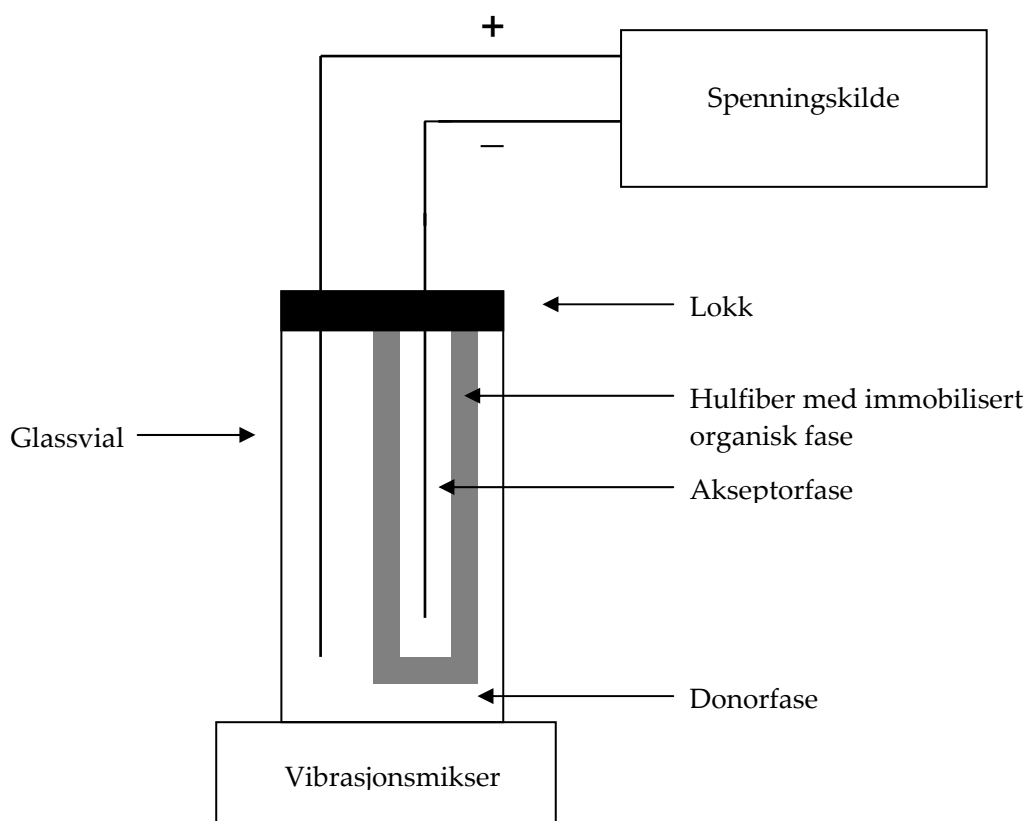
Kunnskapen om EME og mulighetene som ligger i denne metoden blir stadig større. EME er vist å kunne brukes til ekstraksjon av både sure [11] og basiske [10,12] legemidler og fungerer på ekstraksjoner fra ulike typer prøvematriks. Det er gjort forsøk med vandige prøver og urin- og plasmaprøver [10], og resultatene viser at dette er en metode som fungerer godt uavhengig av prøvematriksene. Forsøkene har vist at den kjemiske sammensetningen av den organiske membranen har mye å si for utbyttet av ulike substanser. Basiske substanser ekstraheres godt av nitrerte aromater mens sure substanser ekstraheres godt med alifatiske alkoholer [10-12]. Det er også vist at spenningen påsatt systemet har innvirkning på utbyttene. Frem til nå har EME i all hovedsak vært utført ved høye spenninger (50 V og høyere) mens det er svært liten kunnskap om hva som skjer når spenningen justeres ned til 10 V og lavere [10-12].

Denne oppgaven har sett på hva som skjer når spenningen justeres til lave spenninger som 1 – 10 V og hvordan de organiske membranene kan modifiseres for å optimalisere ekstraksjonene ved lav påsatt spenning. Utgangspunktet er 7 basiske modellsubstanser, som alle er omtalt tidligere i litteraturen i forbindelse med EME, og en organisk fase som har vist seg å ekstrahere 5 av de nevnte modellsubstansene godt [10-13].

4 TEORI

Elektromembranekstraksjon (EME) er en videreutviklet form for LPME.

Modellsustanser transporteres fra en donorfase gjennom et organisk løsemiddel, også kalt den organiske fasen, immobilisert i porene i en porøs fiber (samlet kalt den organiske membranen) til en akseptorfase inne i hulfiberlumen. I EME er det et elektrisk potensial som settes på elektroder i donor- og akseptorfasene som driver ekstraksjonen, og ikke en pH – gradient som i LPME. Det tekniske oppsettet for EME er vist i figur 4.1.



Figur 4.1: Ekstraksjonsoppsett for EME

Hulfiberen impregneres med organisk fase og akseptorfasen fylles i hulfiberlumen.

Det hele festes i et hull i lokket på glassvialen, som inneholder donorfasen.

Elektrodene settes i donorfasen (gjennom et lite hull i lokket) og i akseptorfasen i

hulfiberlumen, og spenning kobles til slik at elektroden i akseptorfasen har motsatt ladning av modellsubstansene som skal ekstraheres. Hele oppsettet plasseres på en vibrasjonsskilde slik at det blir ristet mens ekstraksjonen skjer.

Elektrokinetisk migrasjon av modellsubstansene forutsetter at hele ekstraksjonsenheten opptrer som en elektrisk krets når spenning settes på [10]. Det betyr at alle 3 delene av systemet må være egnet til å lede strøm. Vandig donor- og akseptorfase leder strøm godt, så den avgjørende delen blir den organiske membranen. For at strøm skal kunne gå gjennom den organiske membranen må ioner kunne migrere gjennom den. Det oppnås hvis den organiske fasen i hulfiberen har en viss polar karakter slik at ionene er løselige i den. Den organiske fasen må være polar nok til at en migrasjon kan finne sted, men ikke for polar da dette kan gi økt gassdannelse i donor- og akseptorfasen som følge av elektrodereaksjonene:

Negativ elektrode: $2 \text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$

Positiv elektrode: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2 \text{H}^+ + \frac{1}{2} \text{O}_2 + 2\text{e}^-$

Det forutsettes at den organiske membranen og modellsubstansene er inerte for disse reaksjonene [10]. Teoretisk sett vil disse endringene kunne gi en endring av pH i donor- og akseptorfasen og dermed endre forutsetningene som er lagt til grunn for ekstraksjonen [14]. Dette blir vurdert nærmere i kapittel 6.2.10.

I tillegg til den påsatte spenningen må pH i donor- og akseptorfasen justeres slik at man sikrer en fullstendig ionisering av modellsubstansene. For basiske modellsubstanser gjøres dette med f. eks 10 mM HCl. Når spenningen settes på vil de da positivt ladede modellsubstansene migrere mot den negativt ladede elektroden inne i akseptorfasen.

Den organiske fasen velges ut fra ulike kriterier. Den må, som tidligere nevnt, ha evne til å gi en migrasjon av ioner og det avhenger av at den har en viss polar karakter. Den organiske fasen må kunne solvatisere ladete modellsubstanser og dette avhenger også av substansenes fordelingskoeffisient i den organiske fasen. En høy fordelingskoeffisient angir at modellsubstansen har en sterk fordeling inn organiske løsningsmidler, og er dermed lettere ekstraherbar enn en modellsubstans med en lav fordelingskoeffisient [8]. Den organiske fasen kan ikke være blandbar med den vandig donor- og akseptorfasen. Hvis den er blandbar med vann vil den kunne lekke ut i både donor- og akseptorfasen, og ekstraksjonen vil være mislykket. Et siste kriterium er at den organiske fasen må kunne immobiliseres i porene til hulfiberen og dermed danne en stabil organisk membran. Den organiske fasen holdes fast i porene med kapillærkrefter.

Ekstraksjonsutbyttene i EME avhenger at det skjer en transport av ioner fra donor- til akseptorfasen. Denne massetransport skjer i 4 trinn: Transport innad i donorfasen, transport i grenseflaten mellom donorfasen og den organiske membranen, transport innad i den organiske membranen og til slutt en transport ut til akseptorfasen. Massetransporten skjer ved 3 ulike mekanismer: konveksjon, diffusjon og elektrokinetisk migrasjon [14]. Konveksjon av ekstraksjonsenheten oppstår som følge av at enheten er satt på en vibrasjonsmikser. Diffusjon skjer på samme måte som i LPME (kapittel 3). Det er vist at den elektrokinetiske migrasjonen skjer i alle 4 trinnene og at dette særlig spiller inn i trinnene som omfatter den organiske membranen og akseptorfasen da konveksjon ikke skjer her [8, 13]. Ulike modellsubstanser er vist å ha ulik elektrokinetisk mobilitet gjennom den organiske membranen, og dette åpner for å utvikle svært selektive ekstraksjonsenheter [8].

I det siste er det blitt jobbet med å finne en teoretisk forklaring på hvordan ekstraksjonen skjer, og hva som styrer utbyttene av den. Gjelstad et al [13] har vist at den modifiserte Nernst – Planck likningen (1) kan brukes til å forklare fluksen av

ioner over en organisk membran. Fluksen er definert som antall molekyler som går gjennom et imaginært plan i løpet av en gitt tid.

$$J_i = \frac{-D_i}{h} \left(1 + \frac{v}{\ln \chi} \right) \left(\frac{\chi - 1}{\chi - \exp(-v)} \right) (c_{od} - c_{oa} \times \exp(-v)) \quad (1)$$

Fluks, J_i , bestemmes av diffusjonskoeffisienten D_i , tykkelsen på membranen h , konsentrasjonen av ioner på grenseflaten mellom donorfasen og den organiske membranen C_{od} , konsentrasjonen av ioner på grenseflaten mellom den organiske membranen og akseptorfasen C_{oa} , forholdet mellom ionekonsentrasjon i donor- og akseptorfasen (kalt ionebalansen) χ og av $v = z_i e \Delta \phi / kT$, hvor z_i er ladningen til ionet, $\Delta \phi$ er potensialforskjellen som oppstår på grunn av den påsatte spenningen, k er Boltzmanns konstant og T er absolutt temperatur.

Diffusjonskoeffisienten er substansspesifikk og den angir hvor raskt substansene migrerer gjennom den organiske membranen. Diffusjonskoeffisienten avhenger også av hvilken organisk fase som benyttes i membranen. Tykkelsen på membranen bestemmes av veggtykkelsen til hulfiberen. Konsentrasjonene som angis er konsentrasjonen i grenselaget mellom de ulike fasene, og ikke konsentrasjonen i donor- og akseptorfasene. Det betyr at substansenes fordelingskoeffisient også vil påvirke fluksen, da den er med på å avgjøre hvilken andel av substansen som fordeles inn i grenselaget mellom de 2 fasene. Ionebalansen kan endres ved f. eks å redusere molariteten av HCl i donorfasen mens akseptorfasen holdes på 10 mM HCl. Da vil forholdet mellom de 2 bli mindre, og dette kan igjen gi en økt fluks over membranen. Ekstraksjonshastigheten er vist å være optimal ved temperaturer rett over romtemperatur. Den påsatte spenningen virker også inn på fluksen, og det er vist at med 2-nitrofenyloktyleter (NPOE) som organisk fase så øker utbyttene jo høyere spenningen er.

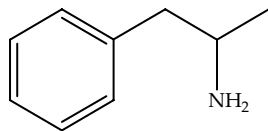
Fra likningen (1) og arbeidet som er gjort, er det endringer i organisk membran, påsatt spenning og ionebalanse som er de mest aktuelle angrepspunktene for videre forskning [13].

5 EKSPERIMENTELT

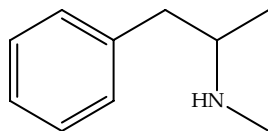
5.1 Karakteristikk av modellsubstansene

Strukturformlene til modellsubstansene er vist i figur 5.1. Tabell 5.1 gir en oversikt over substansenes molekylformel, molekylvekt, pK_a - verdi og $\log P$ – verdi (fordelingskoeffisient oktanol:vann).

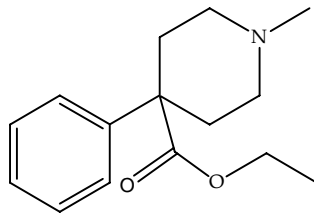
Amfetamin



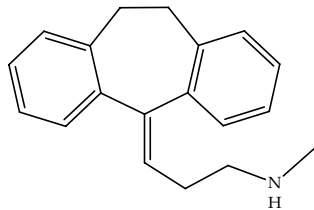
Metamfetamin



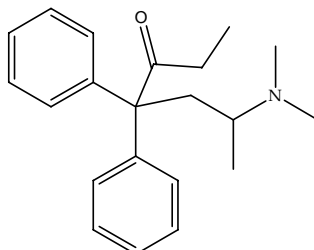
Petidin



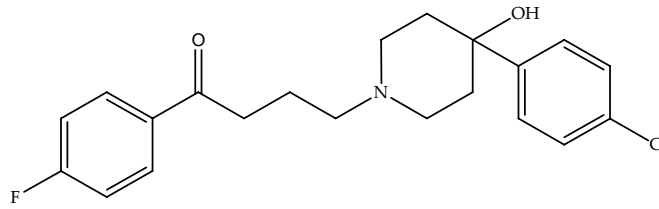
Nortriptylin



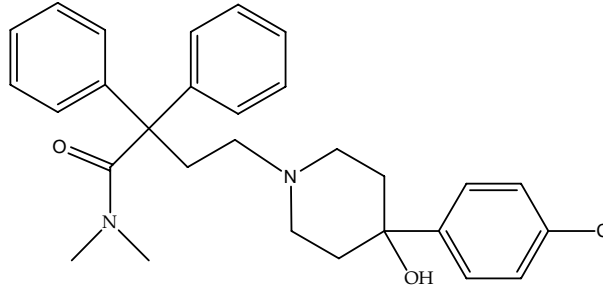
Metadon



Haloperidol



Loperamid



Figur 5.1: Modellsubstansenes strukturformler

Tabell 5.1: Karakteristikk av modellsubstansene

Modellsubstans	Molekylformel	Mw	pK _a	log P
Amfetamin	C ₉ H ₁₃ N	135,2	10,1	1,8
Metamfetamin	C ₁₀ H ₁₅ N	149,2	10,1	2,1
Petidin	C ₁₅ H ₂₁ NO ₂	247,3	8,7	2,7
Nortriptylin	C ₁₉ H ₂₁ N	263,4	9,7	1,7
Metadon	C ₂₁ H ₂₇ NO	309,4	8,3	2,1
Haloperidol	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375,9	8,3	3,2
Loperamid	C ₂₉ H ₃₃ ClN ₂ O ₂	477,0	8,7	5,2

log P er angitt ved pH 7,4 og modellsubstansene vil til en viss grad foreligge på ionisert form ved denne pH. pK_a og log P er hentet fra *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* (3. utgave, Pharmaceutical Press, London, UK, 2004).

5.2 Utstyr og betingelser for elektromembranekstraksjon

Ekstraksjon av modellsubstansene ble utført som vist i figur 4.1. Spenningskilden var ES 0300-0,45 fra Delta Elektronika (Sierikzee, Nederland) med regulerbar spenning i området 0 – 300 V og strøm i området 0 – 450 mA. Halvveis i arbeidet ble spenningskilden byttet til AL 270S Stabilized AC Power Supply fra Alpha Elettronika (Parma, Italia) med regulerbar spenning i området 0 – 15 V. Elektrodene, platinatråder med en diameter på 0,5 mm (K. A. Rasmussen, Hamar, Norge), ble plassert i donor- og akseptorfasene og deretter koblet til spenningskilden.

Glassvialer, 2-SV fra Chromacol (Welwyn Garden City, Storbritannia), med 2 mL volum ble brukt som prøveglass. Som lokk ble det benyttet skrulokk av typen 8-SC-ST15 fra Chromacol. Det ble laget hull i lokket med en hulltang.

Den organiske fasen ble immobilisert i en porøs hulfiber; PPQ3/2 polypropylen hulfiber (Membrana, Wuppertal, Tyskland), med en indre diameter (i.d) på 1,2 mm, veggtykkelse på 200 μm og porestørrelse på 0,2 μm .

Under ekstraksjonene ble oppsettet satt på en Vibramax 100 (Heidolph Instruments, Kelheim, Tyskland) med en innstilt ristehastighet (rpm) på 1050 rpm. Underveis i arbeidet ble det oppdaget at ristehastigheten var blitt justert opp til 1200 rpm. Det vites ikke hvor langt tilbake i tid endringen var skjedd. Det er vist i tidligere forskning at når ristehastigheten økes over 1000 rpm påvirkes ikke utbyttene i noen stor grad [8]. Det er derfor valgt å se bort i fra dette, og i forsøkene det gjelder er ristehastigheten angitt til ca 1100 rpm.

EME ble utført på følgende måte: Donorfasen, 250 μL prøveløsning og 750 μL 10 mM HCl, ble fylt i glassvialen. I noen forsøk ble prøveløsningen fortynnet med andre

løsninger enn 10 mM HCl og dette er angitt der det er gjort. For tillagning av donorfaser med biologiske prøvematriks, se kapittel 5.3 og 6.3. En 2,5 cm lang hulfiber ble mekanisk lukket i den ene enden og deretter loddet fast til en 2 cm lang pipettespiss av polypropylen (Finntip 200 Ext, Thermo Electron, Vantaa, Finland). Pipettespissen fungerte som mekanisk støtte og leder for elektroden. Lengden på hulfiberen ble bestemt slik at volumet av akseptorfasen skulle fylle hele hulfiberlumen. Fiberen ble dyppet i organisk fase i 5 sekunder (s) og overflødig organisk fase ble deretter tørket forsiktig av med fint tørkepapir.

25 μ L akseptorfase ble injisert i hulfiberlumen ved hjelp av en mikrosprøyte. Fiberen, med organisk fase og akseptorfase, ble ført gjennom hullet i lokket til glassvialen, og lokket ble deretter skrudd på. Positiv elektrode ble plassert i donorfasen mens negativ elektrode ble plassert i akseptorfasen i hulfiberlumen. Hele oppsettet ble satt på vibrasjonsmikseren og koblet til spenningskilden. Etter endt ekstraksjonstid ble akseptorfasen overført til en plastvial for videre analyse i CE.

5.3 Biologiske prøver

Humant plasma var fra Ullevål Universitetssykehus og fra frivillige ved Farmasøytisk Institutt. Urin og morsmelk var fra frivillige personer. Prøvene ble oppbevart i fryser ved $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ og tint samme dag som de skulle brukes.

I forsøkene med ulike biologiske prøver bestod donorfasen av 200 – 500 μ L biologisk matriks spiket med modellsubstans og fortynnet til 1 mL med ulike vandige løsninger. De ulike fortytningene er nærmere angitt i kapittel 6.3.

5.4 Bestemmelse av modellsubstansenes fordelingskoeffisient i ulike organiske faser

750 μL standardløsning (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i 10 mM HCl, pH 2) ble pipettert ut til et mikrorør (1,5 ml, Plastibrand, Wertheim, Tyskland) og tilsatt 750 μL organisk fase. Microrøret ble deretter satt på risting i 30 min ved 1050 rpm. Etter endt risting ble røret sentrifugert i 15 min ved 10 000 rpm. Fra supernatanten (den vandige fasen) ble det tatt ut 25 μL med mikrosprøyte for analyse i CE. Det ble utført 3 paralleller fra hver organisk fase og 3 uttak fra hver parallell.

Fordelingskoeffisienten, F , til de fullstendig ioniserte modellsubstansene (som følge av pH 2 i den vandige fasen) ble beregnet etter følgende formel:

$$\log F = \log \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{vann pH 2}}}$$

der C_{org} og $C_{\text{vann pH 2}}$ er konsentrasjonen av modellsubstansene i henholdsvis den organiske og den vandige fasen. $C_{\text{vann pH 2}}$ får man fra analysen i CE, mens C_{org} beregnes etter følgende formel:

$$C_{\text{org}} = C_{\text{start}} - C_{\text{vann pH 2}}$$

C_{start} er utgangskonsentrasjonen i vannfasen, og settes lik 100 %.

5.5 Betingelser for kapillærelektroforese

Akseptorfasene ble analysert med kapillærelektroforese (CE) for å kvantifisere ekstrahert modellsubstans. Analysen ble utført på et MDQ Capillary Electrophoresis

System fra Beckman (Fullerton, CA, USA) utstyrt med en UV – detektor. Kapillæret var et 40 cm langt fused – silika kapillær med en i.d på 75 µm fra Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). For å separere modellsubstansene ble det benyttet en 25 mM fosfatbuffer med pH justert til 2,6 med o-fosforsyre. Bufferen ble oppbevart i romtemperatur, beskyttet mot lys og ble filtrert før bruk. Filteret var et 0,45 µm Minisart RC25 (Sartorius, Hannover, Tyskland). Separasjonen ble utført ved en spenning på 30 kV, som genererte en strøm på 70 – 90 µA. Akseptorfasene ble injisert ved hydrodynamisk injeksjon på 0,5 psi i 5 s. Deteksjon av modellsubstansene ble utført ved 200 nm gjennom en 100 x 800 µm spalte i kapillæret.

5.6 Kjemikalier

Metamfetamin klorid, amfetamin klorid og petidin sulfat var fra Norsk Medisinaldepot (Oslo, Norge). Metadon klorid var av ukjent opprinnelse. Nortriptylin hydroklorid, haloperidol og loperamid hydroklorid var fra Sigma (Steinheim, Tyskland).

Saltsyre, natriumdihydrogenfosfat monohydrat, o-fosforsyre, natriumacetat og eddiksyre var fra Merck (Darmstadt, Tyskland). Etanol var fra Arcus (Oslo, Norge). Metanol var fra VWR (Leuven, Belgia).

2-nitrofenyloktyleter (NPOE), 1-etyl-2-nitrobenzen (ENB), 2-nitrodifenyleter (NDPE), benzyl-2-nitrofenyleter (BNPE), dodecyl-2-nitrofenyleter (DNPE), 1-nitropropan (NPR), nitropentan (NPE) og nitrobenzen (NB) var fra Fluka (Buchs, Sveits). 1-isopropyl-4-nitrobenzen (IPNB) var fra Aldrich (Steinheim, Tyskland).

Tris-(2-etylheksyl)fosfat, nonansulfonsyre, fenylborsyre, 2,4-dinitrobenzensulfonsyre, antrakinon-2-sulfonsyre, 1-heptansulfonsyre og undekansulfonsyre var fra Fluka. Stearylamin, syrerødt 88, dodekansyre, dodecylbenzensulfonsyre, 3-(sykloheksylamino)-2-hydrokxy-1-propansulfonsyre (CAPSO), triisopropylnaftalensulfonsyre, 1-(2-hydrokxy-1-naftylazo)-2-naftol-4-sulfonsyre og trikloreddiksyre var fra Sigma (St.Louis, MO, USA). Difenyfosfat og 1-naftalensulfonsyre var fra Aldrich. Di-(2-etylheksyl)fosfat og naftosyre var fra Sigma-Aldrich (Steinheim, Tyskland).

Til de biologiske prøvene ble det benyttet humant plasma fra Ullevål Universitetssykehus og fra frivillige ved Farmasøytisk Institutt. Urin og morsmelk var fra frivillige personer.

5.7 Standarder og prøveløsninger

Det ble laget en stamløsning med 1 mg/ml av amfetamin, metamfetamin, petidin, nortryptilin, metadon, haloperidol og loperamid i etanol.

Fra stamløsningen ble det ukentlig laget standardløsninger med 10 µg/ml i 10 mM HCl. Prøveløsninger ble laget daglig ved å fortynne standardløsningen videre med 10 mM HCl til ønsket prøvekonsentrasjon, vanligvis 1 µg/ml. I noen av forsøkene ble standard- og prøveløsningene laget i andre konsentrasjoner av HCl, metanol (MeOH) eller destillert vann.

Stamløsningen og standardløsningene ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys.

5.8 Beregning av utbytte og oppkonsentreringsfaktor

Utbyttet (R) for modellsubstansene ved EMI kan beregnes etter følgende likning:

$$R = \left(\frac{n_{\text{akseptor}}}{n_{\text{donor}}} \right) \times 100\% = \left(\frac{V_{\text{akseptor}}}{V_{\text{donor}}} \right) \times \left(\frac{C_{\text{akseptor}}}{C_{\text{donor}}} \right) \times 100\%$$

der n angir antall mol modellsubstans i henholdsvis akseptor- og donorfase, V angir de respektive volumene og C angir konsentrasjonene.

Oppkonsentreringsfaktoren (E) er definert som forholdet mellom endelig og initiell konsentrasjon av modellsubstansene:

$$E = \frac{C_{\text{akseptor}}}{C_{\text{donor}}}$$

Ved 100 % utbytte blir

$$C_{\text{donor}} = \left(\frac{0,250\text{mL} \times 1\mu\text{g/mL}}{1\text{mL}} \right) = 0,25\mu\text{g/mL}$$

$$C_{\text{akseptor}} = \left(\frac{0,25\mu\text{g/mL} \times 1\text{mL}}{0,025\text{mL}} \right) = 10\mu\text{g/mL}$$

$$E = \frac{10\mu\text{g/mL}}{0,25\mu\text{g/mL}} = 40$$

5.9 F – test

I noen av forsøkene er det interessant og nødvendig å sammenlikne flere sett med resultat for å se om de er like eller signifikant forskjellige. Denne sammenlikningen gjøres matematisk i en F – test.

F – testen beregner en F – verdi etter følgende formel:

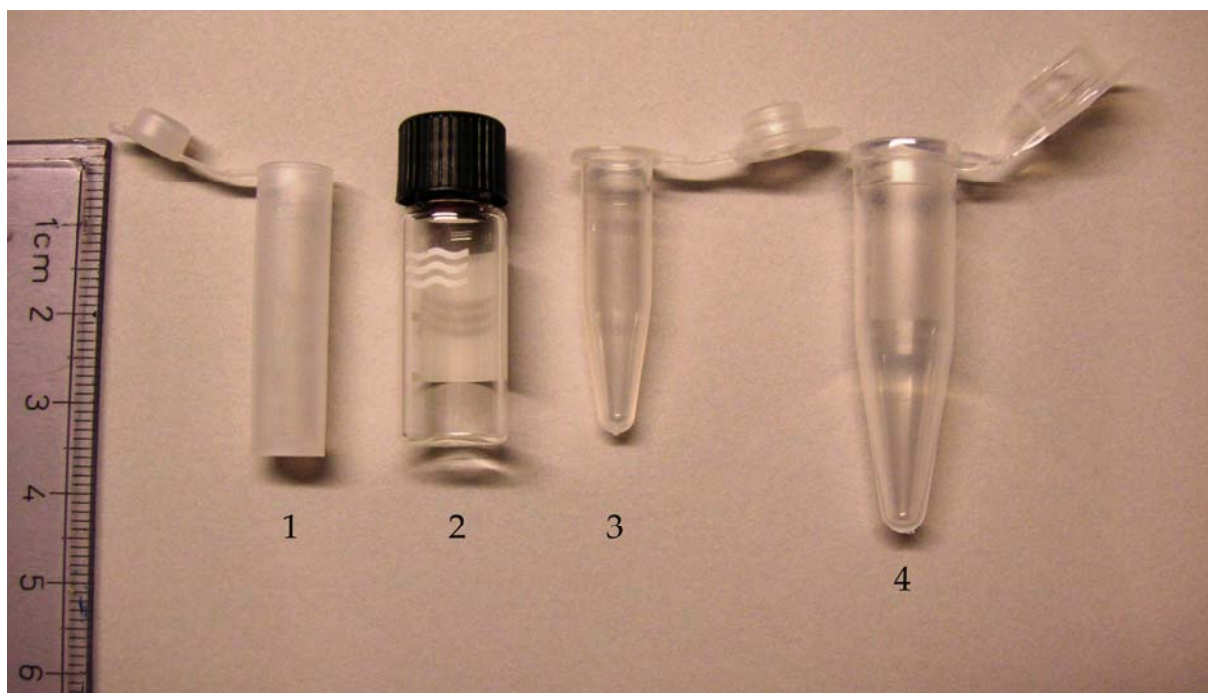
$$F = \frac{\sum_i N_i \times (x_i - \bar{x})^2}{\frac{N-1}{\sum_i (N_i - 1) \times s_i^2} \sum_i (N_i - 1)}$$

der N_i er antall målinger, x_i er gjennomsnittet og s_i er standardavviket i serien i og N er antall serier som skal sammenliknes. Den beregnede F – verdi sammenliknes med den fra tabell, hvor $\sum(N_i - 1)$ og $N - 1$ angir frihetsgrader i henholdsvis nevner og teller. Dersom den beregnede F – verdi er mindre enn den fra tabell er det 95 % sannsynlig at måleseriene er like [15].

6 RESULTATER OG DISKUSJON

6.1 Utvelgelse av prøveformat

Innledningsvis ble det utført ekstraksjoner i 4 forskjellige prøveformat. De ulike formatene varierte i fasong, volum av donor- og akseptorfase samt lengde på hulfiberen (figur 6.1 og tabell 6.1). Totalvolumet av donorfase ble valgt slik at vialen var ca. halvfull og volumet av akseptorfase ble satt til 1/10 av prøveløsningsvolumet. Lengden på hulfiberen ble bestemt slik at akseptorfase fylte hele lumen av fiberen. Ekstraksjoner ble utført med NPOE som organisk fase, ved 10 V i 5 minutter.



Figur 6.1: Ulike prøveformat: 1: Brand Snap Cap, 2: 2-SV, 3: Lite microrør m/lokk, 4: Stort microrør m/lokk..

Tabell 6.1: Karakteristikk av ulike prøveformat

Produsent	Navn/volum	V _{prøveløsning}	V _{donorfase}	V _{akseptorfase}	Fiberlengde
Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Tyskland)	Brand Snap-Cap LDPE 0,8 mL	250 µL	250 µL	25 µL	2,5 cm
Chromacol (Welwyn Garden City, Storbrit.)	2-SV 2 mL Skrulokk: 8-SC-ST15	250 µL	1000 µL	25 µL	2,5 cm
Kartell Spa (Noviglio, Italia)	Microrør m/lokk 01298-00, 0,6 mL	200 µL	250 µL	20 µL	2 cm
Plastibrand (Wertheim, Tyskland)	Microrør m/lokk, PP 1,5 mL	300 µL	750 µL	30 µL	3 cm

Microrørene fungerte dårlig da det var vanskelig å få dem til å stå stabilt når vibrasjonsmikseren ble skrudd på. Det førte til at ekstraksjonsenheten ble stående og hoppe og dermed flyttet elektroden i akseptorfase mye på seg under ekstraksjonen. Dette ga stikkhull i fiberen slik at det ble lekkasje mellom donor- og akseptorfase og dermed en mislykket ekstraksjon. Plastvialen fra Sigma fungerte godt nok, men på grunn av det lille volumet væske det var plass til, ga den lite rom for endringer i sammensetningen av donorfasen. Vialen fra Chromacol stod veldig stabilt under risting, og hadde en stor fordel i at den hadde skrulokk. De andre vialene hadde lokk som ble trykket på, og erfaring tilsa at de kunne løsne under ristingen.

6.2 Utvikling av nye membraner og optimalisering av disse

6.2.1 Screening av organiske faser

Den organiske membranen er det kritiske punktet i ekstraksjonen i EME. Hvis modellsubstansene ikke lar seg ekstrahere gjennom den organiske membranen får man heller ingen utbytter. Fra arbeid som er gjort på LPME vet man at for å oppnå

vellykkede ekstraksjoner må den organiske fasen kunne immobiliseres i porene i hulfiberen, den må ikke være blandbar med vann og den bør være selektiv nok til å ekstrahere modellsubstansene i høye utbytter. Det er også anbefalt den ikke er flyktig slik at man unngår fordampning av den organiske fasen under ekstraksjonen [4]. Det er tidligere gjort forsøk der ulike organiske etere, langkjedede alkoholer og ulike kommersielle oljer som peppermynteolje og soyaolje har blitt forsøkt som organisk fase med ulike oppnådde utbytter. Det er vist at for mange basiske legemidler oppnår man høye utbytter med NPOE, og at utbyttene for de substansene som ekstraheres dårlig av ren NPOE kan økes ved å blande inn alkylerte fosfater i den organiske fasen [10,12]. På bakgrunn av de tidligere forsøkene ble det i dette arbeidet valgt 8 nye organiske faser som kjemisk sett likner på NPOE. De 8 nye organiske fasene ble deretter screenet ved 10 V for å se om de ga bedre utbytter enn NPOE. Resultatene av screeningen er vist i tabell 6.2.

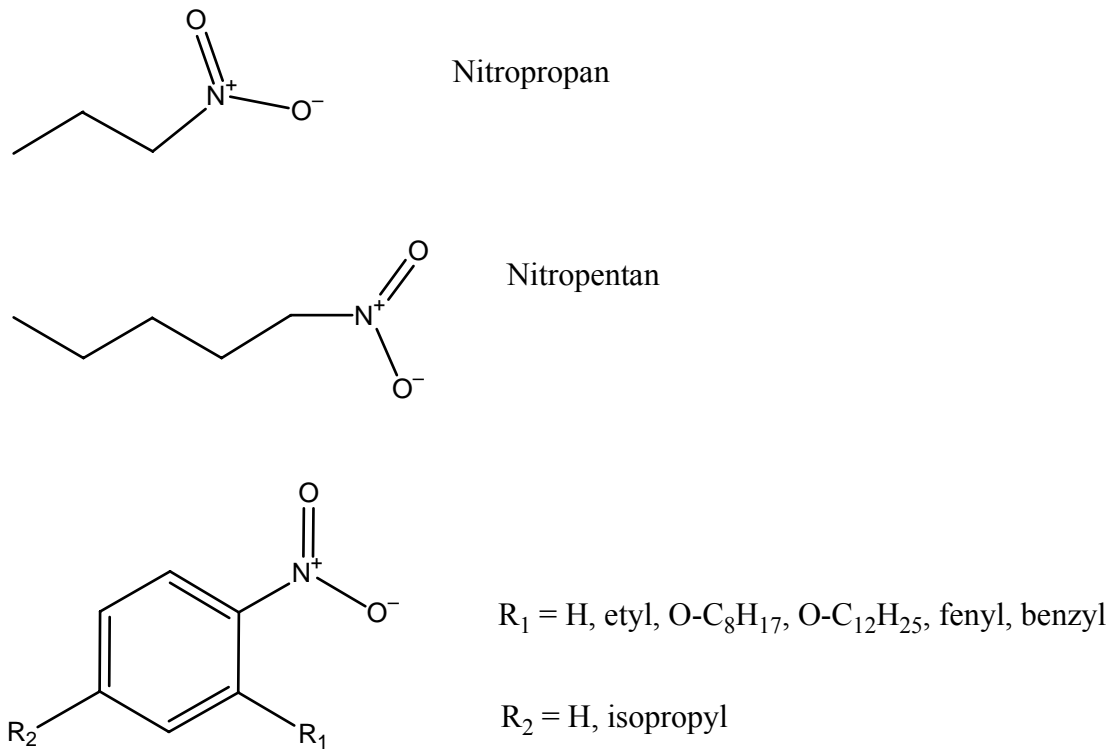
Tabell 6.2. Screening av ulike organiske faser

	Utbytte (%) ^a						
	Amfetamin	Metamf.	Petidin	Nortript.	Metadon	Haloperidol	Loperamid
2-nitrofenyloktyleter	nd	nd	3	18	72	17	74
1-nitropropan	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitropentan	nd	nd	7	7	11	5	3
Nitrobenzen	4	5	14	8	14	11	7
1-etyl-2-nitrobenzen	nd	nd	63	78	80	80	54
1-isopropyl-4-nitrobenzen	nd	nd	59	86	93	91	88
Dodecyl-2-nitrofenyleter	nd	nd	nd	nd	28	nd	49
2-nitrodifenyleter	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Benzyl-2-nitrofenyleter	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

^a *n*=4, 10 V, 5 min, ca 1100 rpm. Metamf. = metamfetamin. Nortript. = Nortriptylin.

Dette var de første systematiske forsøkene med EME som ble utført med lav påsatt spenning, og tabell 6.2 viser at EME fungerer godt også ved 10 V. Tidligere har EME blitt utført med spenninger fra 50 V og oppover [10-12].

Resultatene i tabell 6.2 viste at strukturen til den organiske fasen har stor innvirkning på utbyttene man oppnår. Ved å bruke en kortkjedet alifatisk fase som 1-nitropropan (NPR) ble det generert en for kraftig strøm gjennom systemet slik at det ble en gassdannelse i akseptorfasen. På bakgrunn av dette var NPR uegnet for videre forsøk. Når den alifatiske kjeden økte til pentyl og benzyl i henholdsvis nitropentan (NPE) og nitrobenzen (NB) økte også utbyttene. NPE ga utbytter på 5 av modellsubstansene men i så lave konsentrasjoner sammenliknet med NPOE at også denne ble ansett som uegnet. NB ekstraherte alle 7 modellsubstansene, men resultatene var dessverre ikke reproducerbare. Videre økte utbyttene ved å substituere en ny alifatisk sidekjede på NB som med 1-etyl-2-nitrobenzen (ENB) og 1-isopropyl-4-nitrobenzen (IPNB), mens når den alifatiske sidekjeden ble for lang, som med dodecyl-2-nitrofenyleter (DNPE), ble utbyttet igjen lavt. Når den organiske fasen inneholdt 2 benzengrupper som 2-nitrodifenyleter (NDPE) og benzyl-2-nitrofenyleter (BNPE) fikk man ikke utbytte på noen av modellsubstansene. Årsaken til dette kan være at disse 2 fasene ikke ble godt nok immobilisert i hulfibrene slik at de lakk over i akseptorfasen, og ga egne store topper i elektroferogrammet. Den kjemiske strukturen viser at dette er 2 svært hydrofobe organiske løsemidler, og de kan være for hydrofobe til å ekstrahere modellsubstansene effektivt. Figur 6.2 viser endringene i strukturen til de organiske fasene.

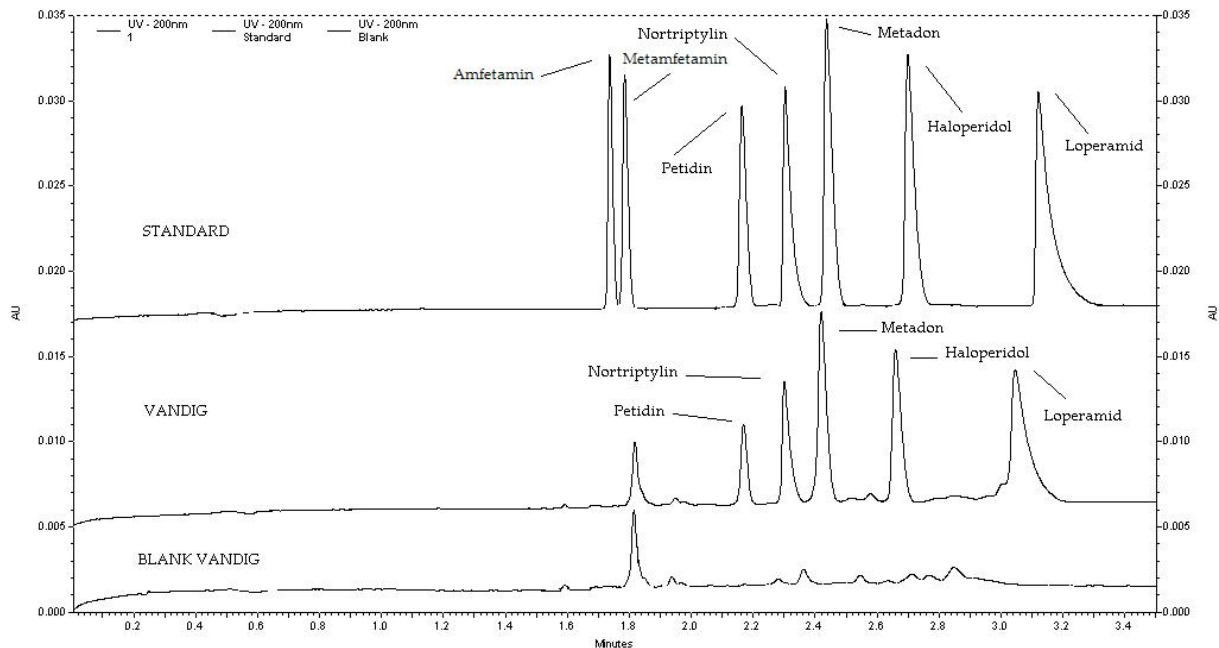


Figur 6.2: Kjemisk struktur av de organiske fasene benyttet i screeningen

På bakgrunn av resultatene fra screeningen ble det besluttet å bruke IPNB, ENB og NPOE i den organiske membranen i videre forsøk.

Amfetamin og metamfetamin ekstraheres ikke av NPOE. IPNB og ENB ga elektroferogram med støytopper som dessverre hadde samme migrasjonstid som eventuelle utbytter for amfetamin og metamfetamin ville hatt. Disse støytoppene kan stamme fra den organiske fasen, forurensninger i den organiske fasen eller at den organiske fasen løser opp komponenter i hulfiberen. På bakgrunn av disse funnene ble det derfor valgt å se bort fra eventuelle utbytter for disse 2 modellsubstansene i de videre forsøkene, til tross for at de fortsatt var en del av stamløsningen, og dermed også en del av standardene og prøveløsningene.

Elektroferogram fra ekstraksjon med IPNB som organisk fase er vist i figur 6.3. Figuren viser tydelig de toppene som interfererer med eventuelle utbytter av amfetamin og metamfetamin.



Figur 6.3: Elektroferogram fra en standard, en vandig prøve ekstrahert med IPNB som organisk fase og en blank prøve ekstrahert med IPNB.

6.2.2 Modellsubstansenes fordelingskoeffisienter

Fordelingskoeffisienten er et mål på hvordan et stoff fordeler seg i en løsning av et organisk løsemiddel og vann [16]. Det er vanlig å angi fordelingskoeffisienten som $\log P$, men det forutsetter at det er fordelingen mellom oktanol og vann man ser på. Ved fordeling mellom et annet organisk løsemiddel enn oktanol og vann, kan man kalle fordelingskoeffisienten $\log F$. Hvis $\log P = 0$ for et stoff betyr det at stoffet har en lik fordeling mellom oktanol og vann. Positive verdier for $\log P$ angir en bedre fordeling i oktanol mens negative verdier for $\log P$ angir at stoffet har bedre fordeling inn i den vandige fasen. Det tilsvarende gjelder for $\log F$ – verdier. I

Nernst-Planck likningen (kapittel 4) ser man at fluksen avhenger av konsentrasjonen av modellsubstansene i grenselaget mellom 2 faser, og denne konsentrasjonen er fordelingskoeffisienten med å på bestemme. Dersom fordelingskoeffisienten til petidin i IPNB er veldig ulik den i NPOE kan det være med på å forklare det forbedrede utbyttet man ser fra 3 % til 59 % ved å bytte organisk fase fra NPOE til IPNB (tabell 6.2) fordi fluksen gjennom den organiske fasen blir endret. Det ble gjort forsøk for å bestemme fordelingskoeffisienten til de ioniserte modellsubstansene i 3 ulike organiske faser (kapittel 5.4) og resultatene er vist i tabell 6.3.

Tabell 6.3: Modellsubstansenes fordelingskoeffisienter i ulike organiske faser

Modellsubstans	log P (oktanol/vann)	log F (NPOE/vann)	log F (IPNB/vann)	log F (ENB/vann)
Petidin	2,7	- 1,7	- 1,1	- 1,3
Nortriptylin	1,7	- 1,3	- 0,9	- 1,0
Metadon	2,1	- 0,4	- 0,6	- 0,9
Haloperidol	3,2	- 1,1	- 0,6	- 0,9
Loperamid	5,2	0,7	0,5	0,0

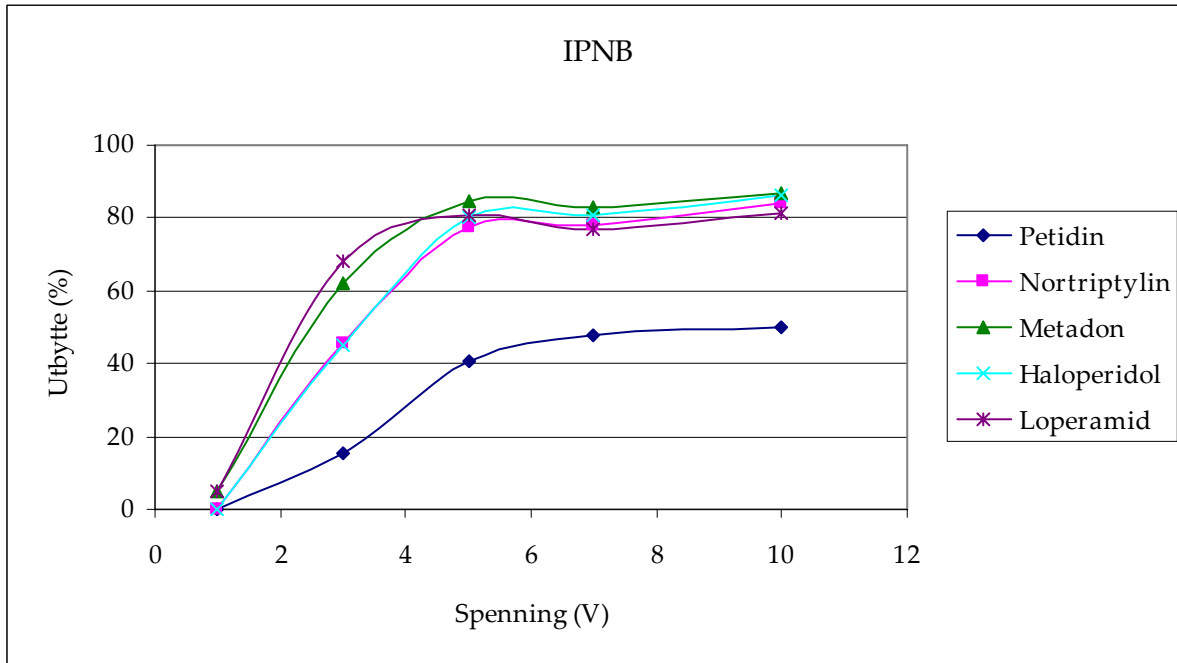
Modellsubstansene vil foreligge på ionisert form i alle fordelingsforsøkene. Når oktanol er benyttet er pH i den vandige fasen 7,4, mens pH er 2 i de andre forsøkene. Resultatet viser at selv om modellsubstansene er ioniserte så får de en fordeling inn i den organiske fasen. Samtidig sees det en forskjell i fordelingskoeffisienter mellom de ulike organiske fasene. IPNB og ENB ga begge bedre ekstraksjonsutbytter enn NPOE (tabell 6.2) og man kunne forvente at fordelingskoeffisientene skulle gjenspeile dette slik at log F – verdiene ville være høyere i de to førstenevnte enn i sistenevnte. En høyere log F – verdi angir at mer modellsubstans fordeles inn i den organiske fasen. Det stemmer imidlertid bare for 3 av modellsubstansene. Petidin, nortriptylin og haloperidol har høyere log F – verdier i IPNB og ENB enn i NPOE som korresponderer med høyere ekstraksjonsutbytter. Når det gjelder forskjellen i

ekstraksjonsutbytter mellom IPNB og ENB er disse såpass små at det er vanskelig å tilegne denne forskjellen i utbytte til forskjell i fordelingskoeffisienter mellom de 2 ulike fasene. De 2 resterende modellsubstansene, metadon og loperamid, har begge høyest log F – verdi i NPOE samtidig som det høyeste ekstraksjonsutbyttet er med IPNB. De 2 ulike organiske fasene har ulik evne til å gi elektrokinetisk migrasjon av ladede modellsubstanser, og dette kan forklare hvorfor utbyttene blir så ulike. I praksis vil det si at med NPOE som organisk fase så fordeles mer modellsubstans inn i den organiske fasen, men transporten gjennom den organiske fasen er dårligere enn når IPNB benyttes. Tilsvarende gir IPNB en lavere fordeling av modellsubstans inn i den organiske fasen, men transporten gjennom er mye bedre enn med NPOE. Totalt sett gir ikke resultatene et klart bilde av hvordan fordelingskoeffisientene i ulike organiske faser påvirker ekstraksjonsutbyttene. Det er vist at det er forskjell i fordelingskoeffisienter og ekstraksjonsutbytter fra ulike organiske faser, men det er ikke blitt funnet en direkte sammenheng mellom de to parametrene.

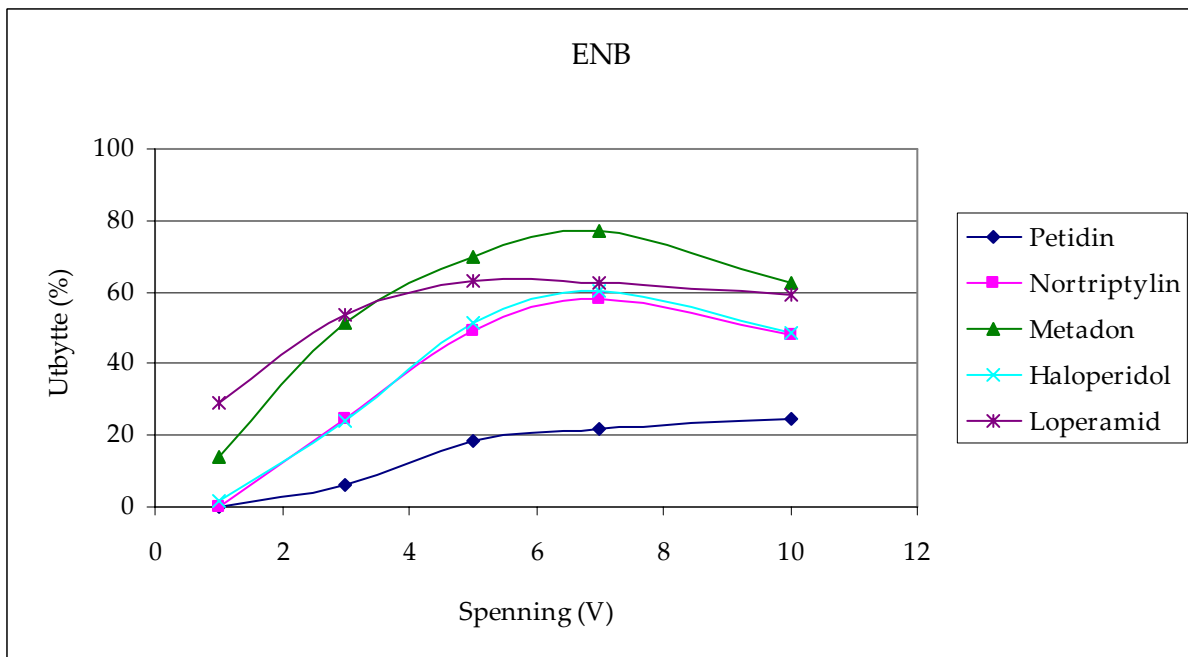
6.2.3 Spenningskurver

De innledende forsøkene har vist at det er mulig å ekstrahere modellsubstansene ved 10 V og at noen organiske faser fungerer bedre enn NPOE. Det var da videre ønskelig å se hvor lav spenning kan man benytte og fortsatt få ekstrahert modellsubstansene. Spenningen som settes på systemet inngår i Nernst – Planck likningen og økt spenning skal gi økt fluks av ioner gjennom den organiske fasen. Det er vist at dersom spenningen justeres fra 300 V til 50 V tar det lengre tid før ekstraksjoner med NPOE kommer i likevekt. Det betyr at hvis man reduserer spenningen kan det være man må øke ekstraksjonstiden for å oppnå de samme utbyttene [13]. Det ble gjort forsøk der effekten av den påsatten spenningen skulle

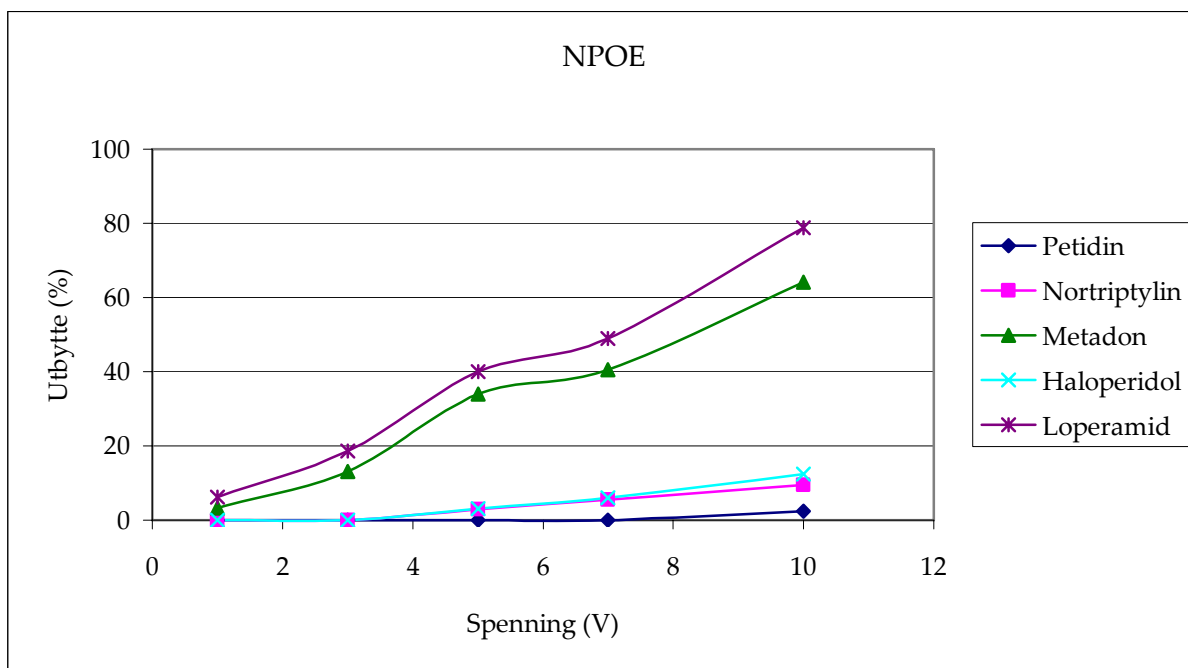
vurderes, og ekstraksjoner ble utført ved 1, 3, 5, 7 og 10 V med IPNB, ENB og NPOE som organiske faser. Resultatene er vist i figur 6.4 – 6.6.



Figur 6.4: Utbytte som funksjon av spenning ved bruk av IPNB som organisk fase. $n = 4, 5$ min, ca 1100 rpm.



Figur 6.5: Utbytte som funksjon av spenning ved bruk av ENB som organisk fase. $n=4, 5$ min, ca 1100 rpm.



Figur 6.6: Utbytte som funksjon av spenning ved bruk av NPOE som organisk fase. $n=4, 5$ min, ca 1100 rpm.

Resultatet viser at med IPNB som organisk fase oppnår man høye utbytter selv ved ekstraksjon ved 5 V for alle 5 modellsubstansene. Når spenningen økes videre til 10 V endres ikke utbyttene nevneverdig, og det ser ut til at systemet gir maksimal stoffluks allerede ved 5 V. Når ENB brukes som organisk fase synker utbyttene når spenningen økes over 7 V. Det kan se ut til at det skjer en tilbakeekstraksjon fra akseptorfasen til enten den organiske fasen eller til donorfasen. Forsøkene med NPOE viser, og bekrefter tidligere resultat fra Gjelstad et al [13], at dette er en organisk fase som trenger høy påsatt spenning for å gi gode ekstraksjonsutbytter.

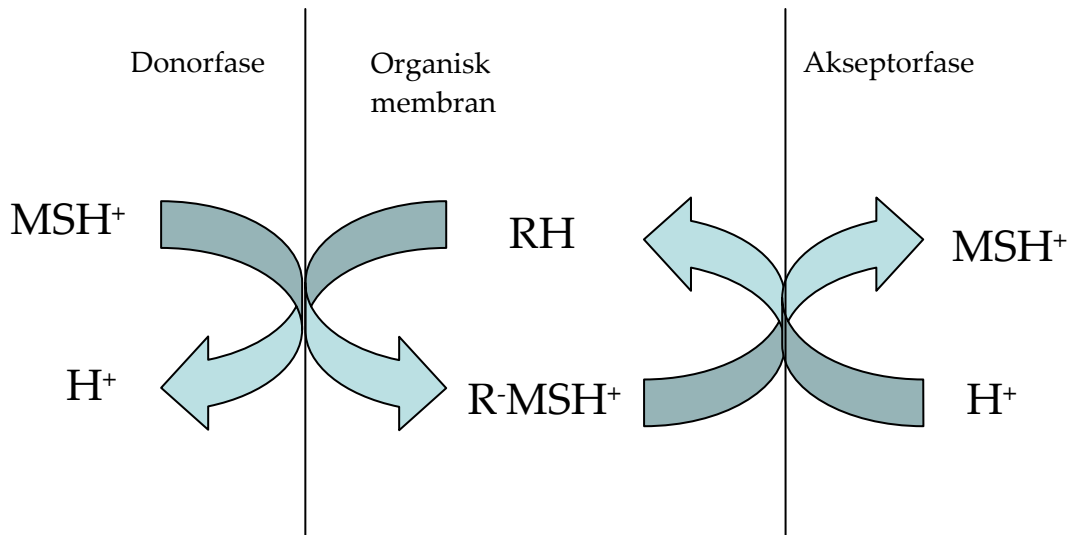
Unntak fra det tidligere nevnte er petidin som ser ut til å ha en tregere kinetikk enn de andre modellsubstansene. Når IPNB brukes kan det se ut som petidin har nådd likevekt ved 10 V, mens med ENB og NPOE trengs det høyere spenning til for å oppnå optimal ekstraksjon. Det er sett i tidligere forsøk at petidin er tregere å ekstrahere enn de andre modellsubstansene og at denne modellsubstansen trenger

høyere spenning for å ekstraheres effektivt [13]. Petidin viste lavere fordeling inn i de ulike organiske fasene (kapittel 6.2.2) enn de andre modellsubstansene og de lave fordelingskoeffisientene kan forklare den trege migrasjonen gjennom de organiske membranene.

Denne forsøksserien viser at IPNB fungerer best som organisk fase når det påsettes lave spenninger. Det oppnås gode utbytter allerede ved 5 V. På bakgrunn av dette ble IPNB valgt som organisk fase til de videre forsøkene.

6.2.4 Tilsetning av ulike ionepardannere til den organiske fasen

Spenningskurven for IPNB (kapittel 6.2.3) viste at utbyttene økte mye fra 3 til 5 V, og at ved høyere spenninger ble utbyttene forholdsvis like. Det var derfor ønskelig å se på mulige modifiseringer av IPNB for å øke utbyttene ved 3 V. Tidligere forskning har vist at tilsetning av upolare ionepardannere kan gi økt transport av ladede modellsubstanser gjennom den organiske fasen i LPME og den organiske membranen i EME [12, 17]. Ionepardanneren må ha motsatt ladning av modellsubstansen som skal transporteres gjennom den organiske membranen, og må i dette tilfellet være negativt ladet. Transporten skjer ved at ionepardanneren og modellsubstansen danner et nøytralt hydrofobt kompleks som er løselig i organiske faser. Det nøytrale komplekset dannes på grenseflaten mellom donor- og den organiske membranen. Det transporteres gjennom den organiske membranen ved diffusjon [12, 17], og når det når grenseflaten mellom den organiske membranen og akseptorfasen løses komplekset opp, modellsubstansen frigis inn i akseptorfasen mens ionepardanneren binder et proton fra akseptorfasen og transporteres tilbake i den organiske membranen. Denne prosessen er vist i figur 6.7.



MSH^+ = ionisert modellsubstans, RH = uionisert ionepardanner, $R-MSH^+$ = nøytralt ionepar

Figur 6.7: Transport av nøytrale ionepar gjennom den organiske membranen ved tilsetning av ionepardannere

På denne måten sirkulerer ionepardanneren frem og tilbake i den organiske membranen. Tidligere har det blitt tilsatt alkylerte fosfater som ionepardanner i ulike konsentrasjoner til NPOE for å øke ekstraksjonsutbyttene i EME av både polare og upolare modellsubstanser avhengig av hvilken ionepardanner som ble tilsatt. Eksempelvis lot den polare modellsubstansen atenolol seg ikke ekstrahere med ren NPOE mens når det ble tilsatt 50 % (w/w) di-(2-etylheksyl)fosfat (DEHP) økte utbyttet til 37 %. Tilsvarende økte utbyttet for den upolare modellsubstansen haloperidol fra 53 % til 83 % når det ble tilsatt 5 % (w/w) tris-(2-etylheksyl)fosfat (TEHP) til den organiske fasen [12].

Det ble tillaget IPNB med 5 % (w/w) DEHP, IPNB med 5 % (w/w) TEHP samt IPNB med 5 % av begge ionepardannerne. Disse organiske fasene ble brukt til ekstraksjoner ved 3 V. Resultatet er vist i tabell 6.4.

Tabell 6.4: Utbytte ved tilsetning av DEHP og TEHP til IPNB

	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
IPNB ^b	23	53	77	55	76
5 % DEHP	11	nd	3	nd	nd
5 % TEHP	14	44	63	48	53
5 % DEHP + 5 % TEHP	12	nd	4	nd	nd

^a n=4, ^b n=38, 3 V, 5 min, ca 1100 rpm. RSD < 22 %.

Tabellen viser at det ikke øker utbyttene å tilsette disse to ionepardannerne til den organiske fasen. Resultatene viser også at ved å tilsette DEHP ble utbyttene av nortriptylin, haloperidol og loperamid så lave at de ikke var detekterbare mens utbyttet av metadon ble kraftig redusert. Dette bekrefter resultater fra tidligere forskning; tilsetning av DEHP har negativ effekt på ekstraksjonen av upolare substanser [12].

Det ble besluttet å forsøke med vilkårlige ionepardannere som var tilgjengelige, og til sammen ble 7 ulike forsøkt. Disse ble innveid til 5 % (w/w) i IPNB. Ionepardannerne hadde dårlig løselighet i IPNB og løsningene ble satt til risting, vortexmiksing, eksponering i ultralydbad og deretter sentrifugering. Supernatanten ble brukt til å impregnere hulfibrene slik at det i praksis ble brukt IPNB mettet med ionepardanner. Resultatene er vist i tabell 6.5.

Tabell 6.5: Utbytte ved tilsetning av ulike ionepardannere til IPNB

	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
IPNB ^b	23	53	77	55	76
+ difenylfosfat	nd	nd	nd	nd	nd
+ stearylamin	nd	69	nd	nd	nd
+ dodekansyre	15	39	72	43	65
+ naftosyre	17	20	52	25	15
+ syrerødt 88	22	47	76	49	72
+ nonansulfonsyre ^c	23	64	87	66	78
+ fenylborsyre	32	55	64	56	38

^a n=2, ^b n=38, ^c n=4. 3 V, 5 min, ca 1100 rpm. RSD < 46 %.

Stearylamin og difenylfosfat var uegnede som tilsetning for modellsubstansene. Tilsetning av disse to ionepardannerne førte til at den organiske fasen ikke ble immobilisert i hulfiberen. De 5 resterende ionepardannerne ekstraherte alle 5 modellsubstansene men det var kun nonansulfonsyre som ga utbytter som kunne vurderes opp mot utbyttene med ren IPNB. Det var da ønskelig å se om andre sulfonsyrer kunne fungere bedre enn nonansulfonsyre, og 9 andre sulfonsyrer ble forsøkt. De ble tilsatt IPNB på tilsvarende måte som for de første ionepardannerne. Resultatet er vist i tabell 6.6.

Tabell 6.6: Utbytte ved tilsetning av 5 % sulfonsyrer til IPNB

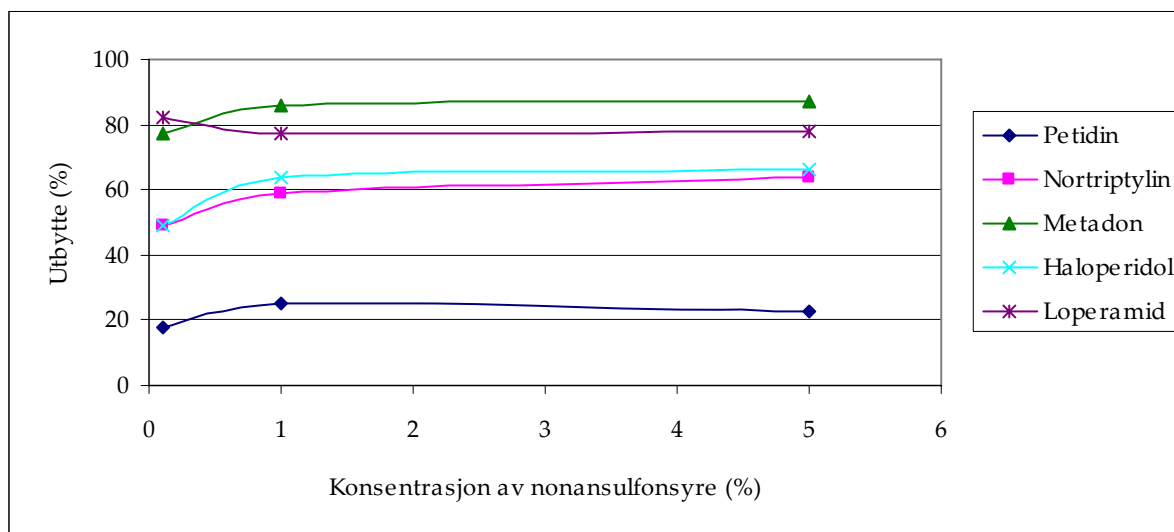
	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
IPNB ^b	23	53	77	55	76
+ nonansulfonsyre ^c	23	64	87	66	78
+ naftalensulfonsyre	12	3	12	nd	nd
+ dodecylbenzensulfonsyre	17	19	70	27	47
+ antrakinonsulfonsyre	18	53	76	53	45
+ 1-heptansulfonsyre	18	48	74	49	72
+ CAPSO	19	51	76	53	69
+ dinitrobenzensulfonsyre	19	52	78	53	65
+ undekansulfonsyre ^c	19	60	83	59	74
+ 1-(2-hydroksey-1-naftolazo)- 2-naftol-4-sulfonsyre	21	47	74	45	51
+ triisopropylnaftalen- sulfonsyre	-	-	-	-	-

^a n=2, ^b n=38, ^c n=4. 3 V, 5 min, ca 1100 rpm. RSD < 32 %.

Tilsetning av triisopropylnaftalensulfonsyre til IPNB gjorde at den organiske fasen ikke ble immobilisert i hulfiberen med det resultat at den lakk ut i både donor- og akseptorfase. Naftalensulfonsyre ga lave utbytter på kun 3 av modellsubstansene men ellers ble modellsubstansene ekstrahert godt ved tilsetning av en sulfonsyre til IPNB. Utbyttene ligger imidlertid noe lavere enn ved ekstraksjoner med ren IPNB, og det var ingen som var bedre enn nonansulfonsyre.

6.2.5 Tilsetning av ulike konsentrasjoner av sulfonsyrer til den organiske fasen

Det var ønskelig å se om endringer i konsentrasjonen av sulfonsyrer tilsatt kunne påvirke ekstraksjonsutbyttene. Sulfonsyrene brukt i 6.2.4 hadde dårlig løselighet i IPNB ved 5 % (w/w) og det var derfor ønskelig å se om løseligheten ble bedret dersom sulfonsyren ble tilsatt i lavere konsentrasjoner til IPNB samt om dette kunne gi økte ekstraksjonsutbytter. Nonansulfonsyre og undekansulfonsyre var de sulfonsyrene som var mest lovende etter forsøkene i 6.2.4 og disse ble derfor brukt. Det ble tillaget 0,1 % (w/w) og 1 % (w/w) av både nonan- og undekansulfonsyre i IPNB på samme måte som tidligere. Resultatet er vist i figur 6.8.



Figur 6.8: Effekt på utbytte ved endring i konsentrasjon av nonansulfonsyre i IPNB. $n=2$ (0,1 %), $n=5$ (1 %), $n=4$ (5 %), 3 V, 5 min, ca 1100 rpm. RSD < 14 %.

Figuren viser at utbyttene er lite avhengig av konsentrasjon tilsatt nonansulfonsyre til IPNB. En F – test på resultatene gir at det 95 % sannsynlig at alle de 3 konsentrasjonene gir like ekstraksjonsutbytter. Forsøket med undekansulfonsyre i IPNB ga tilsvarende resultat som det vist i figur 6.8, og heller ikke der var det noen

signifikante forskjeller i utbytte mellom de ulike konsentrasjonene av tilsatt undekansulfonsyre. Relative standardavvik var i det forsøket lavere enn 16 %.

6.2.6 Tilsetning av nonansulfonsyre til ulike deler av ekstraksjonsenheten

Tilsetning av ionepardannere i LPME har blitt utført ved at ionepardanneren ble tilsatt donorfasen eller den organiske fasen [17-18]. I forsøksserien i 6.2.5 ble ionepardanneren tilsatt den organiske fasen, og det var derfor ønskelig å se hvordan utbyttene ble hvis det ble tilsatt nonansulfonsyre til donorfasen, til den organiske fasen, til akseptorfasen, og til kombinasjoner av faser. Det ble tillaget 1 % (w/w) nonansulfonsyre i 10 mM HCl til donor- og akseptorfaser og til den organiske fasen ble det benyttet samme 1 % (w/w) nonansulfonsyre i IPNB som i de tidligere forsøkene. Resultatene er vist i tabell 6.7.

Tabell 6.7: Utbytte ved tilsetning av 1 % (w/w) nonansulfonsyre i donor- og organisk fase

	Utbytte (%)				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
IPNB ^a	23	53	77	55	76
+ donorfase ^b	40	51	64	48	48
+ organisk fase ^c	25	59	86	65	77
+ donor- og organisk fase ^b	43	51	80	51	53

^a n=38, ^b n=3, ^c n=5, 3 V, 5 min, ca 1100 rpm. RSD < 13 %.

Ved å tilsette ionepardanner i akseptorfasen ble det ikke ekstrahert noe modellsubstans i det hele tatt. Tabell 6.7 viser at petidin ekstraheres bedre når det er tilsatt nonansulfonsyre til donorfasen, mens ekstraksjonsutbyttet av loperamid blir mindre. For de 3 andre modellsubstansene har ikke variasjon i hvilken del av enheten nonansulfonsyre er tilsatt så stor innvirkning på ekstraksjonsutbyttene. For nortriptylin er utbyttene 51 – 59 % med relative standardavvik under 8 %. Det så ut

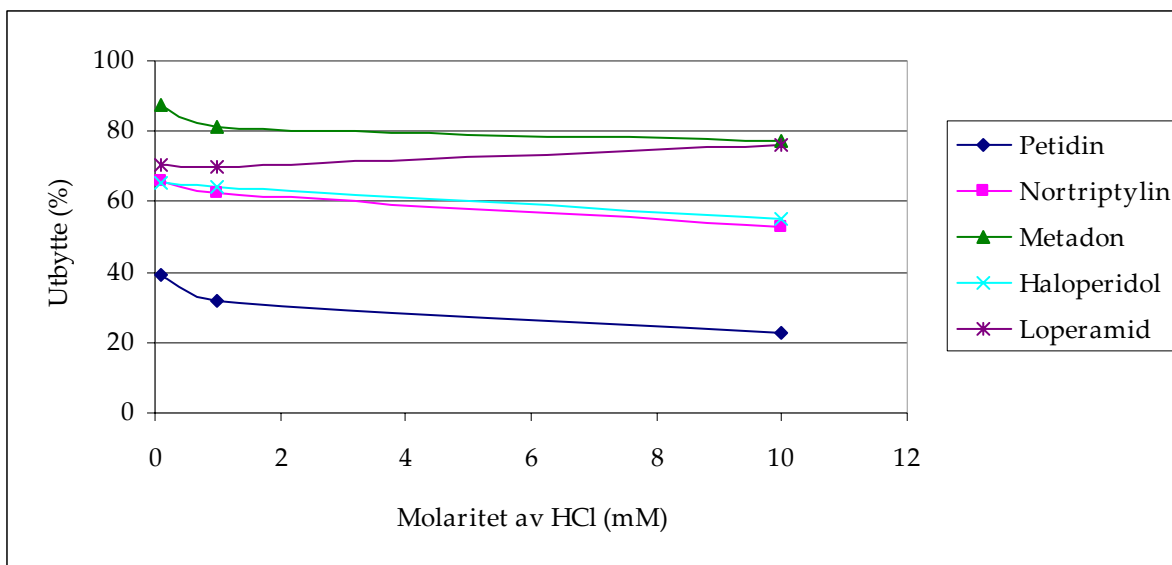
til at tilsetning av nonansulfonsyre til IPNB ikke ga ekstraksjonsutbytter som forsvarte tidsbruken og arbeidet ved selve tilsetningen, og det ble derfor besluttet å gå videre med ren IPNB som organisk fase.

6.2.7 Endring av ionebalansen

Forsøkene med å tilsette ionepardannere til IPNB i ekstraksjoner ved 3 V ga ingen optimalisering av membranen ved den spenningen. Det var derfor ønskelig å se om andre variable kunne gjøre at utbyttene ved 3 V ble like høye som utbyttene oppnådd ved 5 og 10 V.

Nernst – Planck likningen (kapittel 4) viser at ionebalansen, χ , mellom donor- og akseptorfasen har innvirkning på fluksen gjennom den organiske membranen. Ionebalansen er definert som forholdet mellom konsentrasjonen av ioner i donorfasen og konsentrasjonen av ioner i akseptorfasen. Når forholdet mellom de 2 fasene endres, vil χ endres tilsvarende. I forsøkene frem til nå har $\chi = 1$ siden det har vært brukt 10 mM HCl i donorfasen og 10 mM HCl i akseptorfasen. Ved å redusere molariteten av HCl i donorfasen vil χ bli mindre, og fluksen gjennom den organiske membranen vil teoretisk sett bli høyere. Dette skal gi bedre ekstraksjonsutbytter enn når $\chi = 1$.

Det ble gjort forsøk ved 3 V der prøveløsningen ble laget i henholdsvis 0,1, 1 og 10 mM HCl, og fortynnet til donorfase med samme molaritet. Akseptorfasen ble holdt konstant med 10 mM HCl. Dermed varierende χ fra 0,01 – 1. Resultatene er vist i figur 6.9.



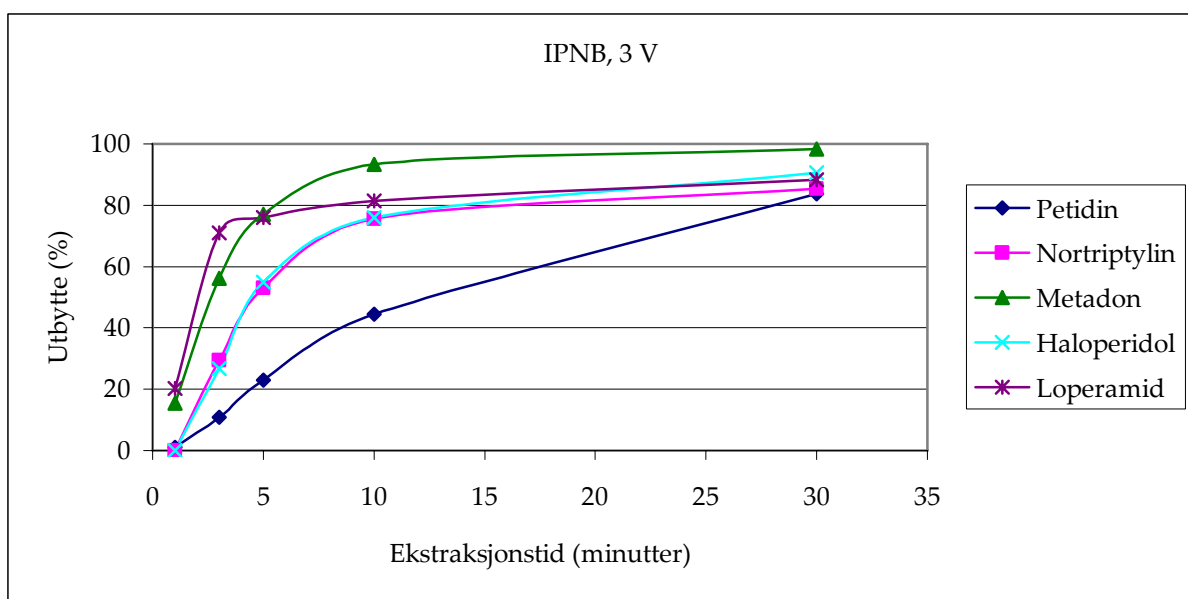
Figur 6.9: Effekt av endring i molaritet av HCl i donorfasen. $n=4$, $n=38$ (10 mM HCl), 3 V, 5 min, 1050 rpm.

Fra figur 6.9 ser det ut til at utbyttet for petidin synker med økende molaritet av HCl og at utbyttet av loperamid gjør det motsatte. For å bekrefte eller avkrefte dette ble det utført en F – test på resultatene. Det ble beregnet F – verdier for de 3 måleseriene og verdiene anga at det var 95 % sannsynlig at utbyttene var like og uavhengige av hvilken molaritet HCl som ble brukt. Det betyr at en endring av molariteten i donorfasen ikke har gitt noen signifikant høyere ekstraksjonsutbytter med IPNB ved 3 V. På bakgrunn av det funnet ble det dermed besluttet å fortsette med lik molaritet av HCl i donor- og akseptorfasen i de videre forsøkene.

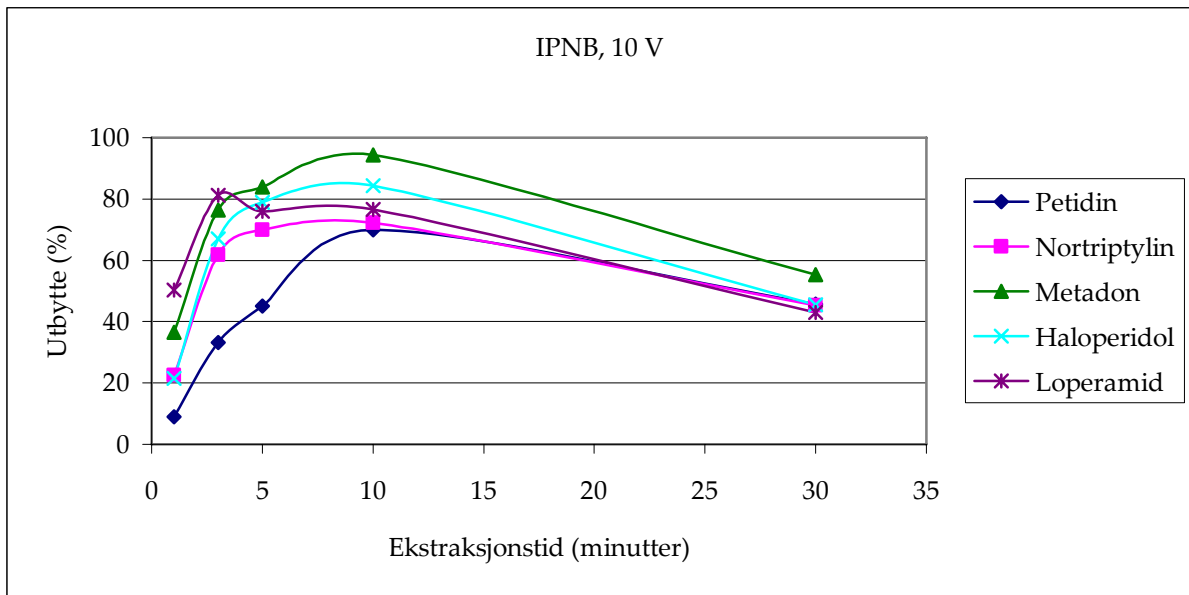
6.2.8 Effekt av endring i ekstraksjonstid

Kortere ekstraksjonstid er en stor fordel med EME fremfor LPME. I noen tilfeller har ekstraksjonstiden blitt 17 ganger kortere med EME enn for tilsvarende ekstraksjon i LPME. Forsøk har vist at mens det tar 40 minutter før ekstraksjonen når likevekt i LPME har det tilsvarende vært oppnådd i EME etter 5 – 15 minutter [8].

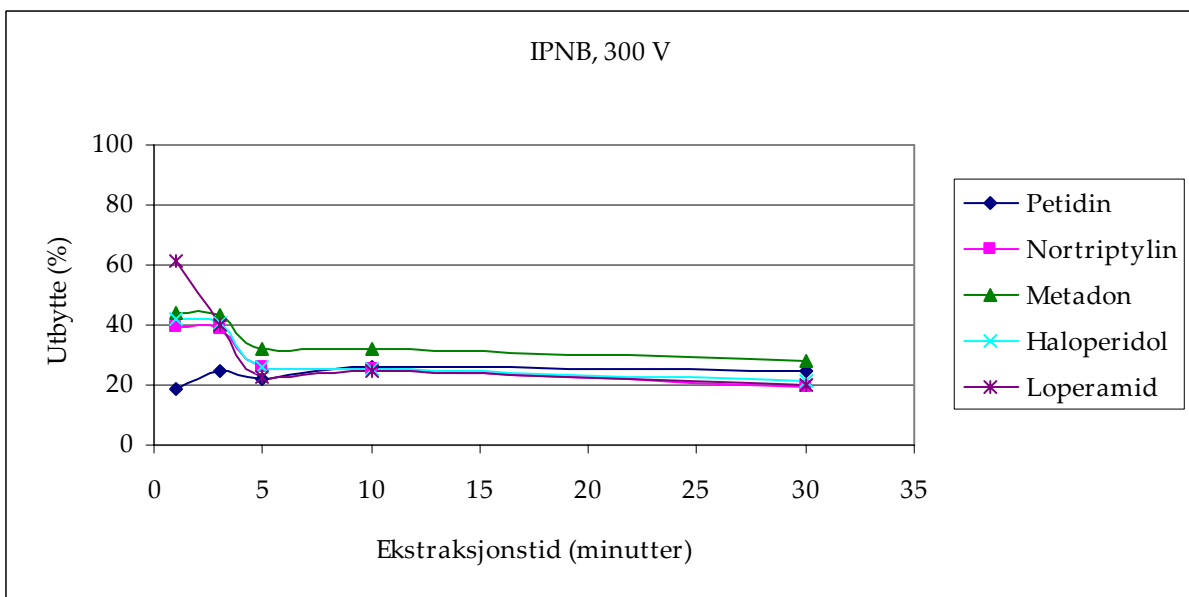
Ekstraksjonene til nå i denne oppgaven har vært utført med 5 minutters ekstraksjonstid. Denne ekstraksjonstiden har vist seg å være lang nok for å gi nær optimale ekstraksjonsutbytter i tidligere publiserte data [8, 10-13]. Det er tidligere ikke undersøkt om lavere påsatt spenning fører til at systemet trenger lengre tid før ekstraksjonen er optimal. For å kunne vurdere om dette er tilfelle ble det utført ekstraksjoner i 1, 3, 5, 10 og 30 minutter ved 3 V, 10 V og 300 V med IPNB som organisk fase. De ulike tidskurvene er vist i figurer 6.10 – 6.12.



Figur 6.10: Effekt av endring i ekstraksjonstiden ved 3 V. $n=4$, $n=38$ (5 minutter), 1050 rpm.



Figur 6.11: Effekt av endring i ekstraksjonstiden ved 10 V. $n=4$, $n=70$ (5 min), 1050 rpm.



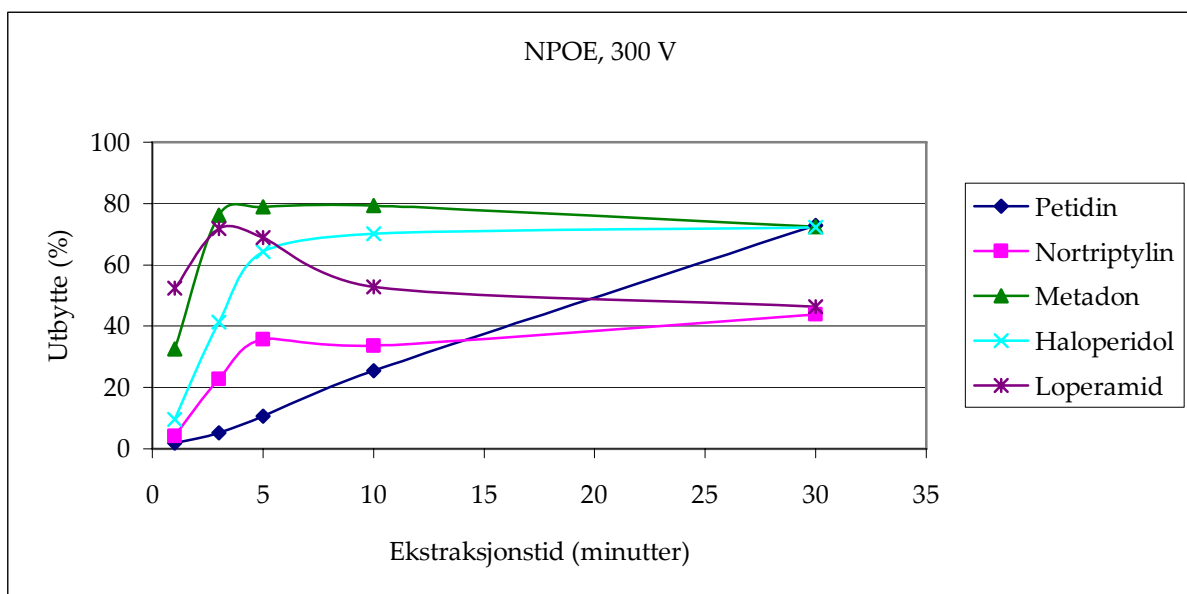
Figur 6.12: Effekt av endring i ekstraksjonstiden ved 300 V. $n=4$, 1050 rpm.

De tre figurene viser tydelig at den påsatte spenningen og ekstraksjonstiden har stor innvirkning på ekstraksjonsutbyttene. Det er imidlertid overraskende at utbyttene ble lavere ved høyere påsatt spenning, det er stikk i strid med den teoretiske bakgrunnen i Nernst – Planck likningen. Ved 3 V kan man oppnå utbytter rundt 90 % etter 30 minutters ekstraksjonstid mens ved 300 V faller utbyttene dramatisk når

ekstraksjonene går lengre enn 1 minutt. Ved både 10 og 300 V synker utbyttene jo lengre ekstraksjonen varer. Det ser ut til at det skjer en tilbakeekstraksjon av modellsubstans til enten den organiske membranen eller til donorfasen. Dette er også observert i tidligere forsøk med NPOE som organisk fase [10]. Hva som eventuelt er grunnen til denne tilbakeekstraksjonen vitnes ikke, men en mulig årsak kan være en pH – endring som følge av reaksjonene som skjer på elektrodene når spenning settes på. Dette ble nevnt i kapittel 4, og vil bli sett mer på i kapittel 6.2.10.

For å ha referanse til tidligere arbeid ble det også gjort forsøk ved 300 V med NPOE som organisk fase der ekstraksjonstiden varierte fra 1 til 30 minutter [8, 10].

Resultatet er vist i figur 6.13.



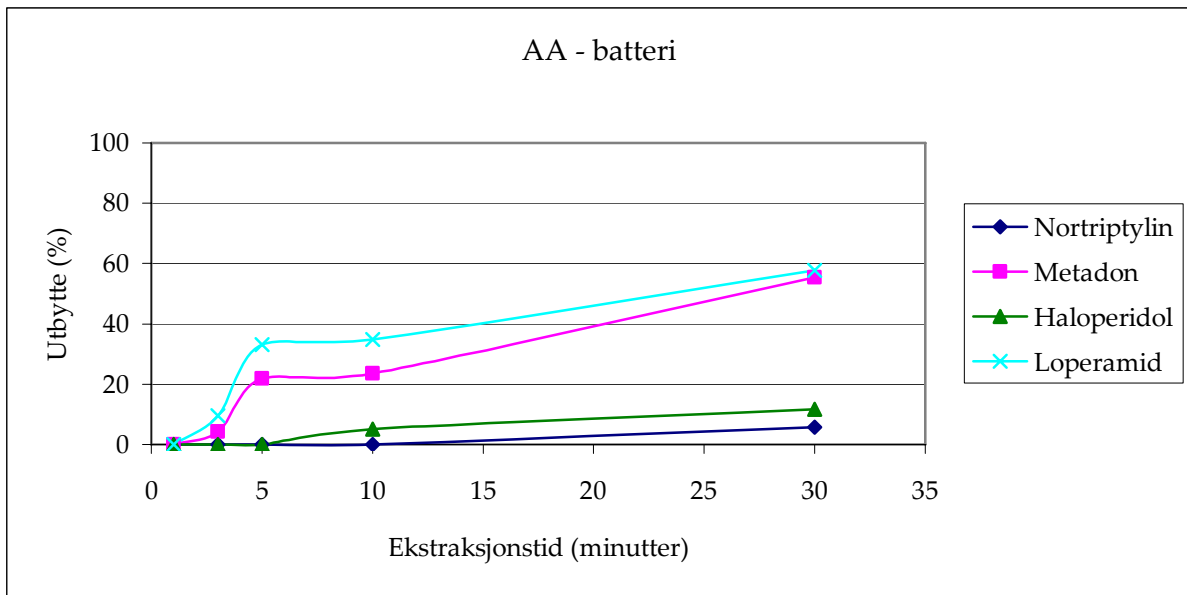
Figur 6.13: Effekt av endring i ekstraksjonstid med NPOE ved 300 V. $n=4$, 1050 rpm.

Forsøket med NPOE viser at det med denne organiske fasen oppnås det ikke forbedrede utbytter ved å øke ekstraksjonstiden over 5 minutter. Petidin er nok en gang et unntak; den har en mye tregere kinetikk enn de andre modellsubstansene og det er først ved 30 minutter at utbyttet når over 70 %.

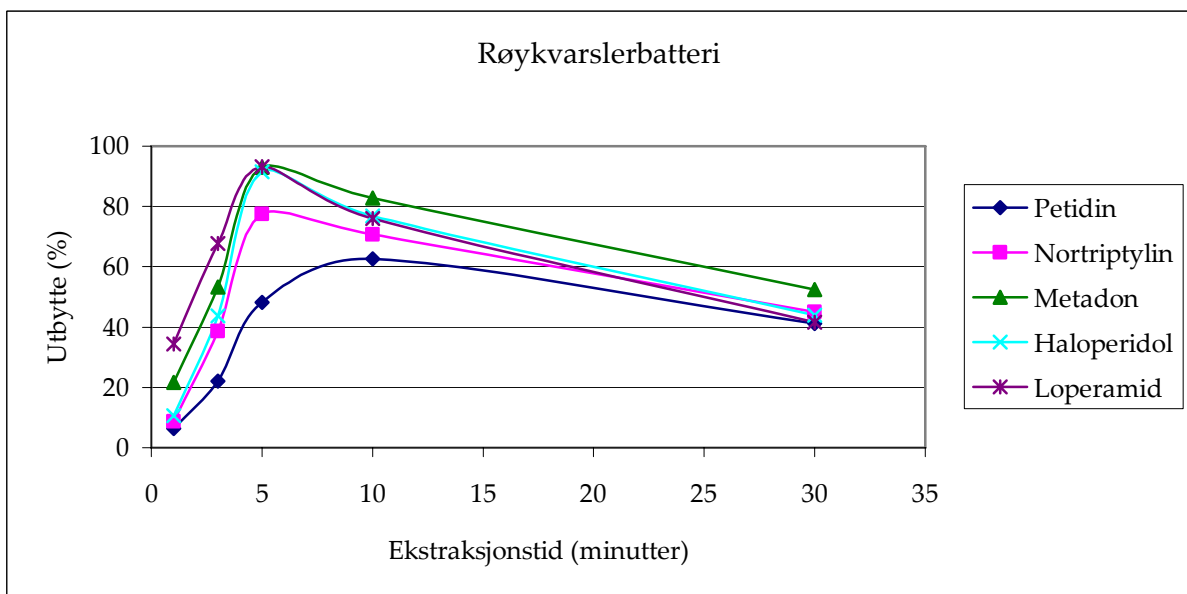
Resultatene i denne forsøksserien bekrefter at ekstraksjonsutbyttene er svært avhengige av hvilken organisk fase som benyttes og at lang ekstraksjonstid ikke gir direkte økte ekstraksjonsutbytter. Fra figurene 6.10 – 6.13 kan man si at utbyttene når sitt maksimum etter en relativt kort ekstraksjonstid, og deretter synker utbyttene jo lengre ekstraksjonen pågår. Det er derfor tydelig at EME er en teknikk som bør utføres ved korte ekstraksjonstider for å være optimal. Det ble besluttet å holde ekstraksjonstiden på 5 minutter i de videre forsøkene.

6.2.9 Batterier som spenningskilde

EME er et konsept som, på grunn av de små formatene det jobbes med og de små mengdene kjemikalier som kreves, kan være en aktuell metode for prøveopparbeidelse i feltarbeid. På bakgrunn av dette var det interessant å se om vanlige batterier kunne fungere som spenningskilde til EME. Hvis dette fungerer får man et ekstraksjonsoppsett som tar minimalt med plass (sett bort fra vibrasjonsmikseren) og dermed lett kan brukes i felten. Det ble utført tidskurver med et AA – batteri og et røykvarslerbatteri som ga en spenning på henholdsvis 1,5 og 9 V. Resultatene er vist i figurer 6.14 og 6.15.



Figur 6.14: Tidskurve med et AA – batteri som spenningskilde. $n=4$, 1,5 V, 1050 rpm.



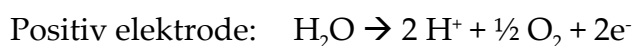
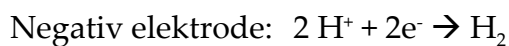
Figur 6.15: Tidskurve med et røykvarslerbatteri som spenningskilde. $n=4$, 9 V, 1050 rpm.

Forsøkene viser at EME gir vellykkede ekstraksjoner selv med vanlige batterier som spenningskilde. AA – batteriet ekstraherte ikke petidin i det hele tatt, og denne modellsubstansen er derfor ikke tatt med i figur 6.14. Resultatene viser at batterier som gir 1,5 V ikke er kraftige nok til å gi høye ekstraksjonsutbytter. Vanlige røykvarslerbatterier derimot, gir utbytter som er sammenliknbare med de som

oppnås med en stasjonær spenningskilde. Disse 2 forsøkene viser at EME kan være en egnet teknikk i feltarbeid fordi formatet kan minimaliseres ved å bruke batterier som spenningskilde.

6.2.10 Endres pH i donor- og akseptorfasene som følge av elektrodereaksjonene?

Når det settes spenning på de to platinaelektrodenes skjer følgende reaksjoner:



Negativ elektrode står i akseptorfasen mens den positive elektroden er plassert i donorfase. Når den påsatte spenningen står på lenge kan det, teoretisk sett, bli fjernet så mye H^+ fra akseptorfasen at pH i fasen stiger [14]. Når pH stiger kan det forhindre at modellsubstansene holdes på fullstendig ionisert form og når modellsubstansene ikke er fullstendig ioniserte vil de få en fordeling tilbake til den organiske membranen. Dermed vil ekstraksjonsutbyttene bli lavere.

Det ble utført ekstraksjoner ved 10 og 300 V i 2, 5 og 30 minutter. Både donor- og akseptorfasene ble tatt ut, og pH ble målt med pH – strips (Acilit® pH 0 – 6, Merck, Darmstadt, Tyskland). Resultatet er vist i tabell 6.8.

Tabell 6.8: pH – endring i donor- og akseptorfase som følge av elektrodereaksjonene

	Ekstraksjonstid (minutter)			
	2	5	30	
Donorfase	2	2	2	10 V
Akseptorfase	2	2	2,5	
Donorfase	2	2	2	300 V
Akseptorfase	2,5	2,5	4	

$n=1$, 1050 rpm.

Tabellen viser at det skjer en pH – endring når ekstraksjonen går lenge. Endringen er størst når ekstraksjonen utføres ved 300 V. Men, endringen er kun 2 pH – enheter til pH 4 og ved denne pH – verdien skal alle modellsubstansene fortsatt være fullstendig ioniserte da deres pK_a – verdier ligger fra 8,3 til 10,1. Det kan allikevel være mulig at den pH – gradienten som oppstår mot donorfasen er kraftig nok til å gi en tilbakeekstraksjon av modellsubstansene til donorfasen. Denne pH – endringen kan derfor være en mulig årsak til det observerte fallet i utbytte ved 300 V med IPNB som organisk fase (figur 6.12).

6.2.11 Utbytte og oppkonsentreringsfaktor under optimale betingelser

Forsøkene med IPNB har vist at dette er en organisk fase som fungerer godt i EME ved lave spenninger. Optimale betingelser ble oppnådd med ren IPNB i den organiske membranen, 10 V som påsatt spenning, 5 minutters ekstraksjonstid og 1050 rpm som ristehastighet. Utbytte og oppkonsentreringsfaktorene oppnådd er vist i tabell 6.9.

Tabell 6.9: Utbytte og oppkonsentreringsfaktor under optimale betingelser

	Utbytte (%)	Oppkonsentreringsfaktor (E)
Petidin	45	18,0
Nortriptylin	70	28,0
Metadon	84	33,6
Haloperidol	79	31,6
Loperamid	76	30,4

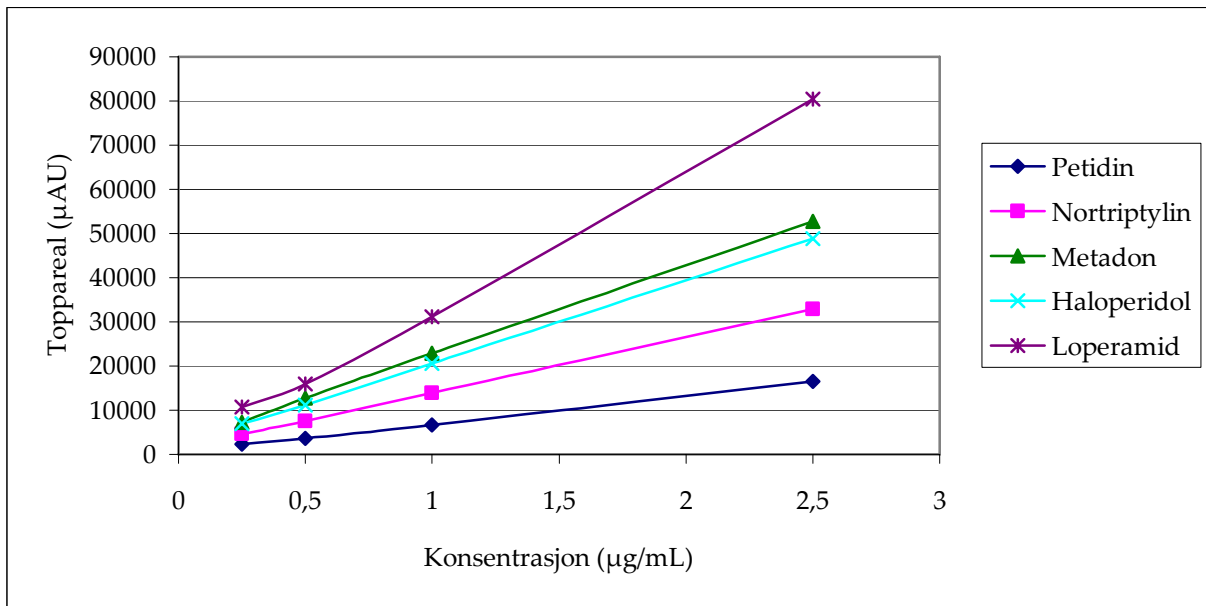
n=70, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 12 %.

6.2.12 Linearitet

Etter forsøkene med å optimalisere den organiske membranen på ulike måter og å endre spenning og tid uten å ha oppnådd noen signifikant bedre utbytter ble det besluttet å fortsette med ren IPNB som organisk fase og de optimale betingelsene som nevnt i 6.2.11.

Med standardbetingelsene satt var det ønskelig å karakterisere systemet med tanke på en validering. Et kriterium i en validering er å se om metoden gir en lineær sammenheng mellom respons og konsentrasjon av modellsubstansene. Tidligere forskning med NPOE som organisk fase ved 300 V har vist linearitet i konsentrasjonsområdet 100 ng/mL – 2,5 µg/mL med r^2 – verdier i området 0,9988 – 0,9999 [10]. For en rekke hydrofile modellsubstanser har linearitet blitt vist i konsentrasjonsområdet 250 ng/mL – 1 µg/mL med r^2 – verdier i området 0,9969 – 0,9988 etter innblanding av DEHP i NPOE [12].

Det ble laget prøveløsninger med følgende konsentrasjoner: 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1 µg/mL og 2,5 µg/mL i 10 mM HCl. Ekstraksjonene ble utført ved 10 V i 5 minutter. Resultatet er vist i figur 6.16.

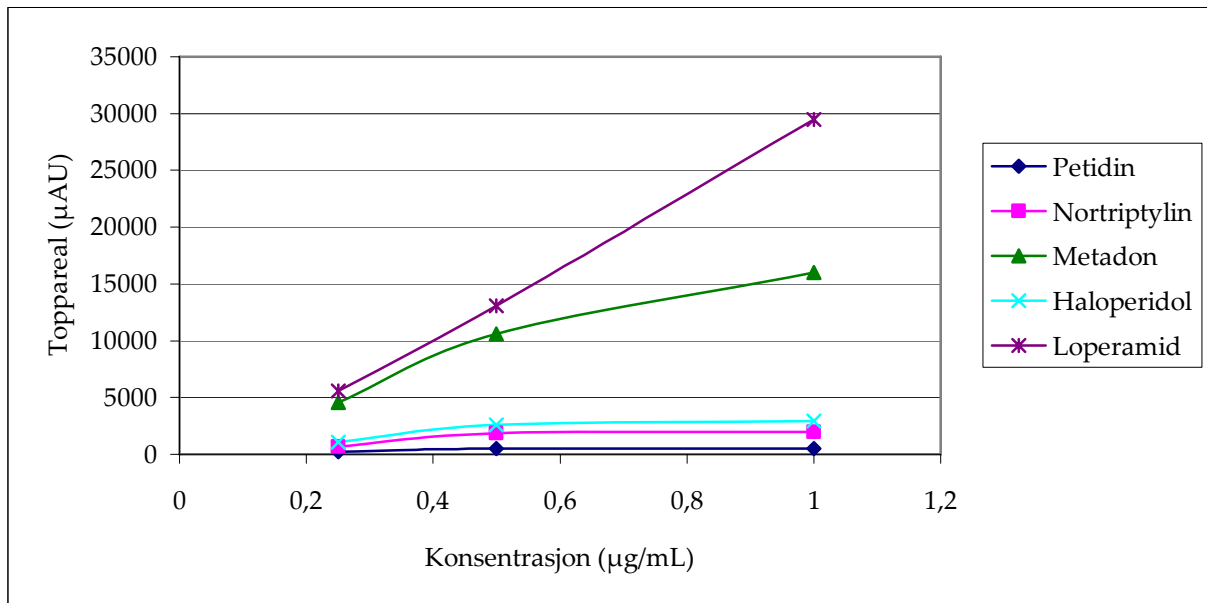


Figur 6.16: Linearitet i IPNB. $n=6$, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 25 %.

Figur 6.16 viser topparealet fra analysen i CE som en funksjon av konsentrasjonen av modellsubstans. Det ble beregnet r^2 – verdier for hver av de 5 modellsubstansene, og de lå i området 0,992 – 1. Det er anbefalt at r^2 skal ha en verdi på minst 0,999, men lavere kan også aksepteres, avhengig av hva metoden skal brukes til [16]. Det var 2 av de beregnede verdiene som lå under den anbefalte grensen, og det var petidin ($r^2 = 0,992$) og loperamid ($r^2 = 0,9979$). Verdiene for disse 2 modellsubstansene er likevel så nær den anbefalte verdien at det kan sies å være en lineær sammenheng mellom toppareal og konsentrasjon i konsentrasjonsområdet 250 ng/mL – 2,5 μg/mL for alle 5 modellsubstansene.

Det høye relative standardavviket, RSD, (25 %) stammer fra den laveste konsentrasjonen, 250 ng/mL, og kan skyldes usikkerhet i målingene fra CE – apparatet i seg selv, og ikke nødvendigvis fra selve ekstraksjonsprosessen. Ved de øvrige konsentrasjonene var RSD i området 4 – 18 %.

Det har tidligere blitt vist linearitet i NPOE ved høy spenning, men det er ikke blitt undersøkt om lineariteten også er til stede ved lave spenninger. Det ble utført samme forsøk som over med NPOE som organisk fase med prøveløsninger i konsentrasjonsområdet 250 ng/mL – 1 µg/mL. Resultatet fra disse forsøkene er vist i figur 6.17.



Figur 6.17: Linearitet i NPOE. $n=4$, $n=1$ (petidin, 250 ng/mL), 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 56 %.

Figur 6.17 viser at resultatet med NPOE som organisk fase ble ganske annerledes enn det som er vist i figur 6.16 for IPNB. Som tidligere er utbyttene lavere (lavere toppareal) samtidig som det ikke ser ut til å være noe lineær sammenheng for andre enn loperamid. Beregning av r^2 – verdier bekrefter dette. For loperamid er r^2 – verdien 0,9996 mens for de andre modells substansene ligger verdiene på 0,5804 – 0,9505 der den laveste verdien er for petidin. Det er derfor ikke grunnlag for å si at det er noen lineær sammenheng mellom toppareal og konsentrasjon når NPOE brukes som organisk fase ved lav spenning. Dette forsøket bekrefter enda en gang at NPOE er uegnet som organisk fase ved lav spenning.

6.2.13 Linearitet ved endret ionebalanse

Det har tidligere i denne oppgaven blitt vist at det ikke er noen signifikante forskjeller i utbytter når ionebalansen endres (kapittel 6.2.7). Men, det vites ikke om ionebalansen kan ha innvirkning på utbyttene når konsentrasjonen av modellsubstans i donorfasen blir lavere. Det ble derfor utført linearitetsforsøk ved ulike molariteter av HCl i donorfasen. Det ble gjort forsøk med 250 ng/mL, 500 ng/mL og 1 µg/mL prøveløsning i 0,1, 1 og 10 mM HCl. Forsøkene ble utført med IPNB som organisk fase. De beregnede r^2 – verdiene er vist i tabell 6.10.

Tabell 6.10: Endring i r^2 – verdier som følge av endring av ionebalanse

	Molaritet av HCl (mM)		
	0,1	1	10
Petidin	0,9985	0,9866	0,992
Nortriptylin	0,9992	0,9943	1
Metadon	0,9992	0,9964	0,9999
Haloperidol	0,9999	0,9956	0,9999
Loperamid	0,9977	0,997	0,9979

n=4, 10 V, 5 min, 1050 rpm.

Forsøket viser at lineariteten opprettholdes når ionebalansen endres. Det er kun små endringer i r^2 – verdiene, og det kan konkluderes med at lineariteten er uavhengig av ionebalansen mellom donor- og akseptorfase.

6.3 Biologiske prøver

Det meste av den publiserte forskningen på EME omhandler vandige prøver og EME på biologiske prøver har tidligere bare blitt gjort forsøksvis. Det er vist at basiske modellsubstanser kan ekstraheres fra både plasma og urin med utbytter opp mot det som oppnås fra vandige prøver. Elektroferogrammene fra spikede plasma- og urinprøver viste få topper fra endogene substanser fra prøvematrikset, noe som tyder på disse blir effektivt selektert vekk i ekstraksjonen [10]. Det har også blitt forsøkt EME på biologiske prøver spiket med sure modellsubstanser, men det bød på problemer i form av interferens fra endogene substanser og utfellinger av proteiner som ga økt strømføring gjennom ekstraksjonsenheten [19]. De forsøkene som er omtalt ovenfor har alle vært utført ved 50 og 300 V. Det har aldri tidligere blitt omtalt forsøk der EME har blitt utført på biologiske prøver med lav påsatt spenning.

6.3.1 Plasmaprøver

Plasma er supernatanten man får når blod blir tilsatt antikoagulant og deretter sentrifugert. Plasma er en komplisert matriks som består av vann, proteiner (albumin, ulike globuliner og fibrinogen), ioner samt uladete forbindelser som glukose og urea. Plasma inneholder også et viktig buffersystem som holder pH svakt basisk (pH 7,4) [16, 20]. Proteinene i plasma kan binde opp modellsubstanser og de 5 modellsubstansene i denne oppgaven har høy grad av proteinbinding. Petidin er oppgitt til å ha 40 % proteinbinding, mens de 4 andre er oppgitt til å ha 90 – 96 % proteinbinding [21]. Denne høye graden av proteinbinding kan være med på å komplisere ekstraksjonene fra plasmaprøver fordi modellsubstansene kan bli bundet opp i proteinkompleks. Det er vist ved å tilsette metanol (5 – 50 % i vann) til plasmaprøver før en LPME, så brytes bindingene mellom protein og modellsubstans,

og ekstraksjonsutbyttet øker for modellsubstanser med høy grad av proteinbinding i plasma [22]. For å få en optimal ekstraksjon fra plasmaprøver står man overfor 2 utfordringer: hvordan overskride bufferkapasiteten i plasma slik at pH kan justeres for å oppnå fullstendig ionisering av modellsubstansene og hvordan bryte bindinger mellom modellsubstans og plasmaproteinene.

6.3.1.1 Overskridelse av bufferkapasitet i plasma

En måte å bryte bufferkapasiteten i plasma er å tilsette syre. Da blir pH – balansen i prøven forskjøvet, og tilsetning av nok syre vil overskride bufferens evne til å kompensere for tilsetningene. Det ble utført forsøk med plasmaprøver med tilsetninger av en acetatbuffer og ulike molariteter av HCl. Ved å sikre at pH holdes tilstrekkelig sur ioniseres modellsubstansene fullstendig og en ekstraksjon kan bli utført under optimale betingelser.

Det ble laget donorfaser der 200 – 500 µL plasma ble spiket med 250 µL prøveløsning (1 µg/mL) og deretter fortynnet til 1 mL totalvolum. pH ble målt med pH – strips (Acilit® pH 0 – 14, Merck). De ulike donorfaserne er vist i tabell 6.11.

Tabell 6.11: Ulike donorfaser med spiket plasmaprøver

Prøveløsning laget i	Volum plasma	Fortynnet med	pH
H ₂ O	500 µL	H ₂ O	7
0,1 mM HCl	500 µL	0,3 mM HCl	7
10 mM HCl	200 µL	10 mM HCl (1:5)	7
10 mM HCl	500 µL	30 mM HCl (1:1)	7
10 mM HCl	200 µL	Acetatbuffer	4
100 mM HCl	500 µL	300 mM HCl	1
1 M HCl	500 µL	3 M HCl	1

Prøveløsningene med HCl ble fortynnet med HCl med en tre ganger så høy molaritet for å oppnå riktig totalkonsentrasjon i donorfasen. Ved å blande plasma, prøveløsning i 10 mM HCl og deretter fortynne med 30 mM HCl ble totalkonsentrasjonen 10 mM HCl. Fra tabell 6.11 ser det ikke ut til at det har noen betydning om plasmaprøven ble fortynnet med 10 eller 30 mM HCl; bufferen i plasma kompenserte for begge deler og pH ble holdt på 7. Det var kun de 2 sterkeste HCl – løsningene og acetatbufferen som var i stand til å bryte bufferkapasiteten. Det ble gjort ekstraksjoner med alle 7 variantene, og utbyttene er vist i tabell 6.12.

Tabell 6.12: Ekstraksjonsutbytter ved ulike donorfaser med spiket plasma

	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
H ₂ O	35	16	34	21	21
0,1 mM HCl	35	18	33	20	22
10 mM HCl (1:5)	42	32	46	38	36
10 mM HCl ^b (1:1)	42	25	42	32	29
Acetatbuffer ^c	38	37	44	40	35
100 mM HCl	27	25	43	33	27
1 M HCl	-	-	-	-	-

^a n=3, ^b n=6, ^c n=12, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 22 %.

Tabell 6.12 viser at ekstraksjonsutbyttene blir lavere når det blir brukt HCl med høyere molaritet enn 10 mM. Det ble observert en svak utfelling av proteiner i donorfasene med acetatbuffer og 100 mM HCl, og en fullstendig blakking av prøven med 1 M HCl. I disse utfellingene kan modellsubstans ha blitt fanget opp slik at det ble mindre modellsubstans tilgjengelig for ekstraksjon fra donorfasen. Dette ser ikke ut til å være tilfelle for acetatbufferdonorfasene da disse ga utbytter som var sammenliknbare med utbyttene med 10 mM HCl. I disse donorfasene ble pH 4 som sikrer en fullstendig ionisering av modellsubstansene. Med 10 mM HCl ble det oppnådd gode utbytter selv om det ikke var noen stor pH – endring i plasma fra den

naturlige pH ~ 7,4. Det er også interessant at selv når prøveløsningen er laget i rent vann og plasma ble fortynnet med rent vann så oppnådde man ekstraksjonsutbytter på 16 – 35 %. Det betyr at modellsubstansene må ha en viss grad av ionisering selv ved pH 7 som gir en elektrokinetisk migrasjon, og dermed en fluks gjennom den organiske membranen.

6.3.1.2 Felling av proteiner i plasma

Den andre utfordringen med plasmaprøver er tilstedeværelsen av proteiner og hvordan unngå at modellsubstansene blir bundet opp i komplekser med proteinene. I prøveopparbeidelse er proteinfelling et vanlig trinn for å fjerne forurensninger fra prøven [16]. Det utføres ved å tilsette et fellingsreagens til prøven, sentrifugere og deretter bruke supernatanten videre. Proteinene i prøven blir liggende igjen som et bunnfall i prøvevialen. De første forsøkene med plasmaprøver viste at det kan være tap av noe modellsubstans som følge av bindinger til proteiner. Det var ønskelig å se om dette kunne unngås og samtidig få bekreftet om det stemte at modellsubstansene ble bundet opp med proteinene. Det ble laget donorfaser hvor proteinfellingen ble gjort direkte i prøven med metanol (MeOH) og trikloreddiksyre (TCA) og det ble forsøkt å bruke ferdigfelt plasma som deretter ble spiket. De ulike donorfasene er vist i tabell 6.13 og ekstraksjonsutbyttene er vist i tabell 6.14.

Tabell 6.13: Ulike donorfaser med proteinfelling

Prøveløsning laget i	Volum plasma	Fortynnet med
MeOH	500 µL	MeOH
10 mM HCl	500 µL	10 % TCA i H ₂ O
10 mM HCl	500 µL (ferdig felt m/ 10 % TCA i H ₂ O)	10 mM HCl

Tabell 6.14: Ekstraksjonsutbytter etter proteinfelling

Fellingsreagens	Utbytte (%)				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
MeOH ^a	15	15	25	17	45
TCA (direkte felling) ^b	25	11	16	13	nd
TCA (ferdig felt) ^b	45	45	52	46	35

^a n=3, ^b n=4, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 28 %

Tabell 6.14 viser at det skjer en ko-felling av modellsubstans når fellingen skjer direkte i donorfasen. Utbyttene ligger dobbelt så høyt når ferdig felt plasma benyttes i forhold til når felling med samme reagens gjøres direkte i donorfasen. Tabellen viser også at når proteinene felles direkte i donorfasen med TCA så tapes utbyttet av loperamid fullstendig. Det antas at dette tapet av loperamid skyldes den høye proteinbindingsgraden (96 %) slik at modellsubstansen felles sammen med proteinene som felles direkte i prøven. Det høye utbyttet på loperamid når MeOH benyttes som fellingsreagens kan være en tilfeldighet da RSD på den målingen var 22 %. Den situasjonen man har i forsøkene med ferdig felt plasma vil aldri bli en reell analysesituasjon. Dette er fordi med plasmaprøver fra pasienter så vil substansene man skal analysere allerede være i plasmaprøven når prøven tas, og de vil ikke bli tilsatt etter felling. Disse forsøkene er dermed kun med for å vise at ved en direkte felling i donorfasen så tapes en del modellsubstans i fellingen og at modellsubstansene har en binding til plasmaproteiner.

På bakgrunn av forsøkene med bufferkapasitet og proteinfelling i plasma var tilsetningen av acetatbuffer det som bidro til best mulige betingelser. Med acetatbufferen ble pH i prøven tilstrekkelig sur og det var kun en svak proteinfelling som var synlig. På bakgrunn av dette ble acetatbufferen og fortynningsforholdet 1:5 (200 µL plasma til 1 mL donorfase) valgt for videre plasmaprøver.

6.3.1.3 Plasma fra ulike pasienter

Plasma består som kjent av blant annet vann, ioner, proteiner og noen uladete forbindelser. Om plasma fra ulike personer gir opphav til samme ekstraksjonsutbytter eller om sammensetningen endres fra person til person, og hvordan dette eventuelt virker inn på ekstraksjonsutbyttene, har ikke tidligere vært undersøkt. Det var derfor interessant å se hvordan utbyttene varierte mellom plasmaprøver fra ulike personer. Det ble gjort forsøk med 5 ulike plasmaprøver og resultatene er vist i tabell 6.15.

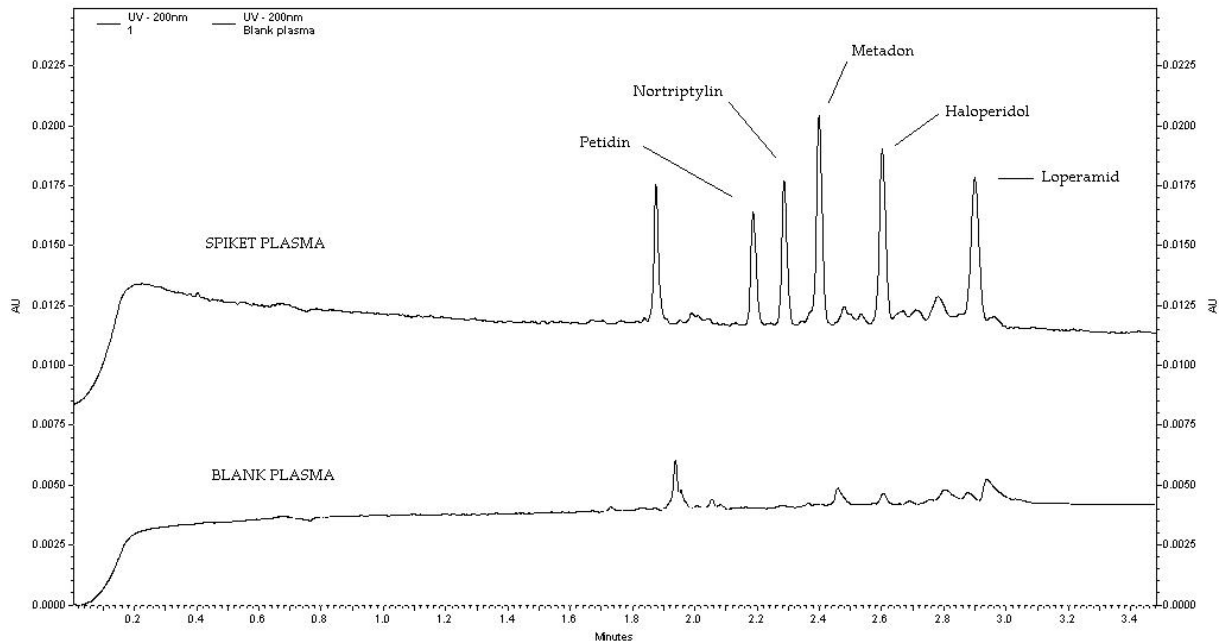
Tabell 6.15: Ekstraksjonsutbytter fra plasmaprøver fra ulike personer

	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
Plasma 1 ^b	38	37	44	40	35
Plasma 2	41	42	47	43	42
Plasma 3	41	38	49	43	40
Plasma 4	35	34	44	37	37
Plasma 5 ^c	34	30	40	35	33

^a n=4, ^b n=12, ^c n=3, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 27 %.

Resultatene fra de 5 ulike plasmaprøvene angir at det ikke er noen forskjell i hvilken prøve ekstraksjonen utføres. Det ble beregnet F – verdier for alle 5 modellsubstansene i de 5 ulike plasmaprøvene, og beregningene viste at ved 95 % konfidensnivå var det ingen signifikant forskjell mellom de ulike prøvene. Dette betyr at resultatene er like og uavhengige av hvilken plasmaprøve som er benyttet samt at metoden ikke er følsom overfor endogene forskjeller i sammensetning av disse plasmaprøvene.

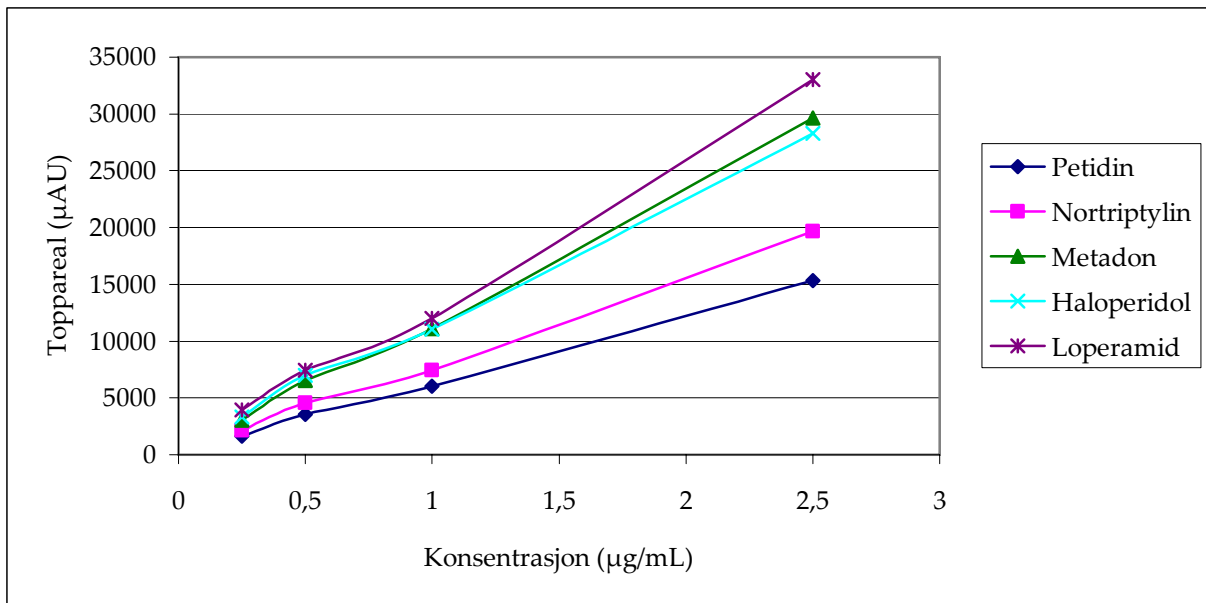
Elektroferogram fra spiket og blank plasma er vist i figur 6.18. Figuren viser at endogene interfererende stoffer blir ekskludert effektivt av den organiske membranen.



Figur 6.18: Elektroferogram fra en spiket og en blank plasmaprøve

6.3.1.4 Linearitet i plasmaprøver

Det har tidligere blitt vist linearitet i vandige prøver i konsentrasjonsområdet 250 ng/mL – 2,5 µg/mL (kapittel 6.2.11). Det var ønskelig å undersøke om dette gjaldt i plasmaprøver også. Det ble laget prøveløsninger med følgende konsentrasjoner: 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1 µg/mL og 2,5 µg/mL i 10 mM HCl. Ekstraksjonene ble utført ved 10 V i 5 minutter. Resultatet av forsøket er vist i figur 6.19.



Figur 6.19: Linearitet i plasma. $n=4$, 10 V, 5 min, 1050 rpm.

Beregning av korrelasjonskoeffisienten, r^2 , gir at det er lineær sammenheng mellom konsentrasjon og respons også når ekstraksjonene utføres på plasmaprøver. r^2 – verdiene er vist i tabell 6.16.

Tabell 6.16: Korrelasjonskoeffisienter ved linearitetsforsøk

	r^2
Petidin	0,9986
Nortriptylin	0,997
Metadon	0,9979
Haloperidol	0,9971
Loperamid	0,9956

Korrelasjonskoeffisientene ligger i området 0,9956 – 0,9986, og dette er akseptabelt i denne sammenhengen som er første gang linearitet i plasma undersøkes ved lav – spennings – EME.

6.3.2 Urinprøver

Utskillelse av urin fra kroppen er en måte å bli kvitt avfallsstoffer på. Kroppen produserer 1,2 – 1,5 L urin daglig og denne vil normalt inneholde urea, urinsyre, kreatinin og salter samt flere andre endogene substanser. Urin fra en frisk person vil normalt sett ikke inneholde store mengder stoff med høy molekylvekt som proteiner. Konsentrasjon og sammensetning av urin avhenger av når urinprøven tas og fra person til person [23].

Tidligere har det blitt utført EME på urinprøver spiket med både sure og basiske modellsubstanser og med høy påsatt spenning. Ekstraksjon av basiske modellsubstanser ga elektroferogram som viste få interfererende topper fra endogene substanser, og utbyttene var sammenliknbare med utbytter fra vandige prøver [10]. Ekstraksjon av sure legemidler viste seg vanskelig da endogene stoffer interfererte med modellsubstansene [19]. Det har ikke tidligere vært forsøkt EME ved lav spenning på urinprøver.

6.3.2.1 Ulike fortynninger og ionebalanse

På bakgrunn av forsøkene med plasmaprøver var det ønskelig å se hvordan ulike molariteter av HCl virket inn på utbyttene fra urinprøver. Det ble tillaget donorfaser som vist i tabell 6.17. pH på urinprøven var 5 som sikrer fullstendig ionisering av modellsubstansene.

Tabell 6.17: Ulike donorfaser med spiket urin

Prøveløsning laget i	Volum urin	Fortynnet med
H ₂ O	500 µL	H ₂ O
0,1 mM HCl	500 µL	0,1 mM HCl
10 mM HCl	500 µL	10 mM HCl
10 mM HCl	200 µL	10 mM HCl
10 mM HCl	200 µL	Acetatbuffer pH 4

Det ble gjort ekstraksjoner med de 5 ulike donorfasene, og resultatene er vist i tabell 6.18.

Tabell 6.18: Ekstraksjonsutbytter ved ulike donorfaser med spiket urin

	Utbytte (%) ^a				
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid
H ₂ O ^b	45	41	50	44	57
0,1 mM HCl ^b	50	45	53	48	58
10 mM HCl (1:1)	46	47	52	49	48
10 mM HCl (1:5)	40	42	49	47	47
Acetatbuffer ^c	37	41	48	47	50

^a n=4, ^b n=3, ^c n= 15, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 32 %.

Resultatene viser at de ulike fortytningene av urinprøvene ikke gir utslag på utbyttene. Urinprøven hadde pH 5, så alle fem modellsustansene var ioniserte i urinen. Det er interessant at fortytning med rent vann gir like gode utbytter som fortytning med 10 mM HCl. Det betyr at modellsustansene ble holdt på ionisert form selv når urinprøven ble fortytnet. De laveste relative standardavvikene (< 13 %) ble oppnådd med acetatbufferen. Det ble besluttet å benytte den donorfasesammensetningen i de videre forsøkene med urinprøver.

6.3.2.2 Urin fra ulike personer og ulike tidspunkt

Urin fra ulike personer kan variere i sammensetning og konsentrasjon. Et tydelig tegn på dette er fargen på urinen som kan variere fra nesten helt blank til mørk guloransje. Morgenurin er mer konsentrert enn ettermiddagsurin. Det var ønskelig å se om disse forskjellene i matriks ville ha innvirkning på ekstraksjonsutbyttene. Det ble benyttet urin fra 5 ulike personer, både kvinner og menn og morgen- og ettermiddagsurin. Fargen på urinen varierte veldig, og pH på urinprøvene var 5 – 6. Resultatene er vist i tabell 6.19. Urin 1 er den samme urinen som brukt i de tidligere forsøkene.

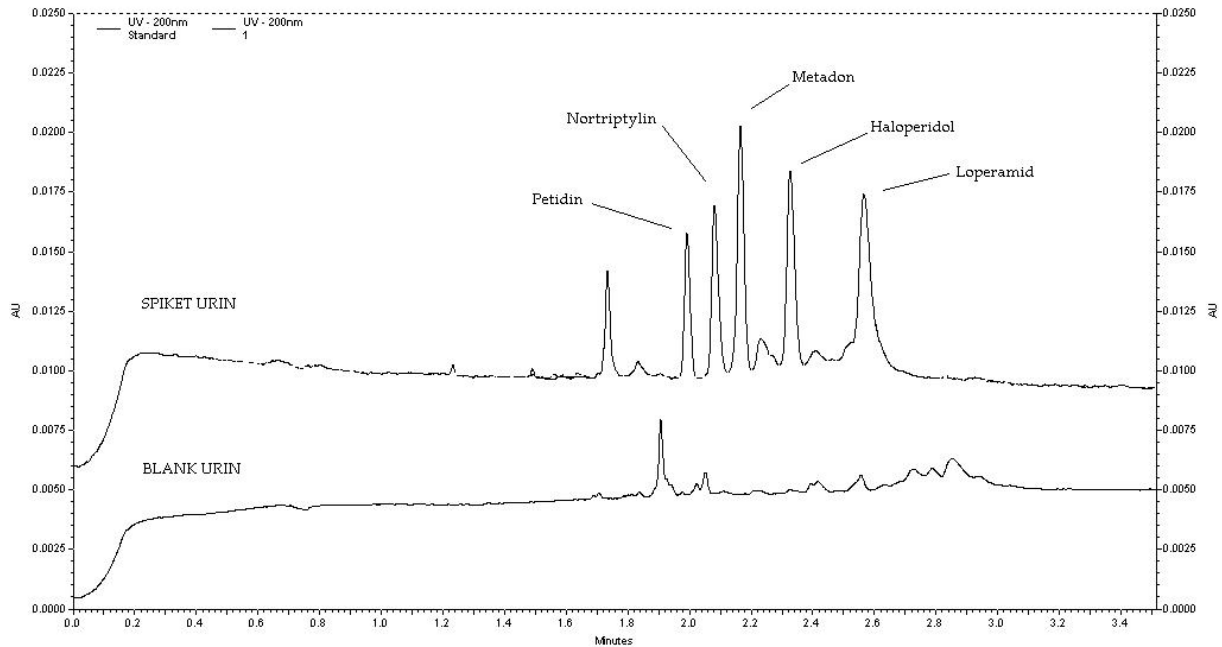
Tabell 6.19: Ekstraksjonsutbytter fra ulike urinprøver

	Utbytte (%) ^a					pH	Tid
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid		
Urin 1 ^b	37	41	48	47	50	5	MU
Urin 2	35	33	40	37	41	5	MU
Urin 3	46	42	52	49	49	5,5	EU
Urin 4	43	47	57	56	55	6	EU
Urin 5 ^c	32	34	37	37	67	5,5	EU

^a n=4, ^b n=12, ^c n=3, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 25 %. MU=morgenurin, EU=ettermiddagsurin

Resultatene viser at utbyttene er uavhengige av om urinen er morgen- eller ettermiddagsurin. Det ser heller ikke ut til at pH på urinen har noen innvirkning på utbyttene. Det kan se ut som urin 5 har et høyere utbytte på loperamid enn de andre prøvene, men dette ble avkreftet av en F – test. En F – test på resultatene viste at det ikke var noen signifikant forskjell mellom ekstraksjonsutbyttene fra de ulike urinprøvene. Det kan dermed konkluderes med at EME på urinprøver er ikke sensitiv for individuelle forskjeller i prøvematrikset.

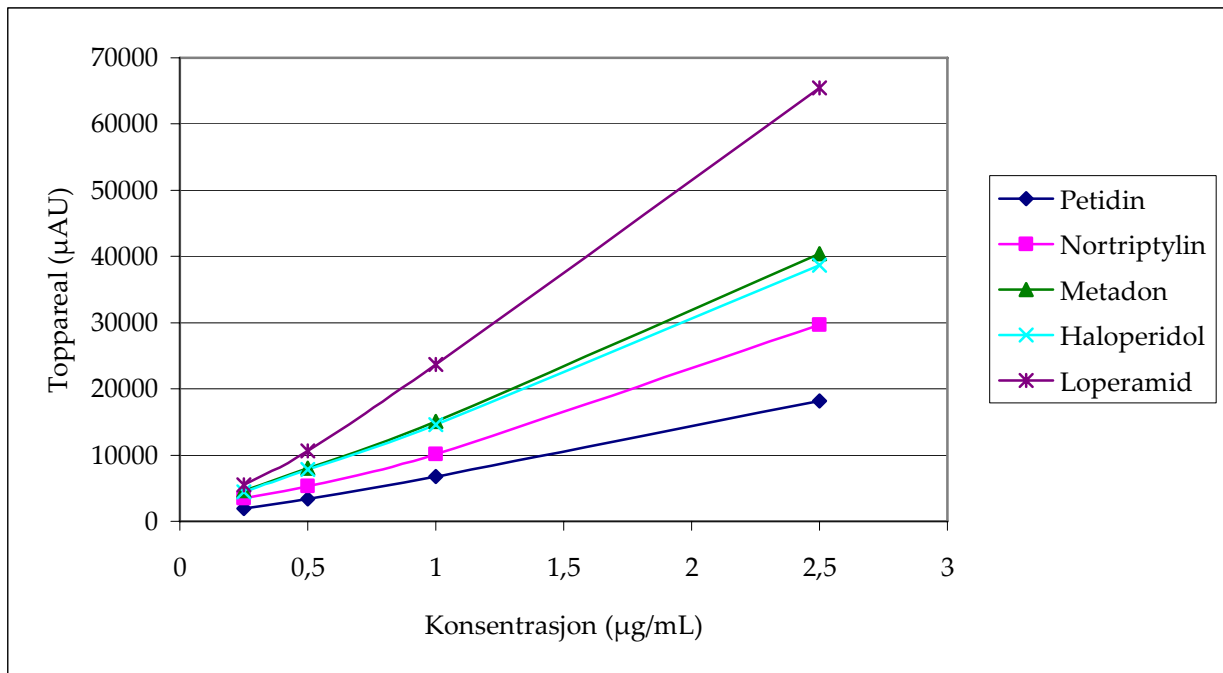
Elektroferogram fra en spiket og en blank urinprøve er vist i figur 6.20. Som med plasmaprøven (figur 6.18) så ekskluderes endogene interfererende topper effektivt.



Figur 6.20: Elektroferogram fra spiket og blank urinprøve

6.3.2.3 Linearitet i urin

Det ble vist en lineær sammenheng mellom toppareal og konsentrasjon av modellsubstans i plasmaprøver i kapittel 6.3.1.4. Det var ønskelig å se om det samme resultatet oppnås når urinprøver spikes med ulike konsentrasjoner av modellsubstansene. Det ble laget til prøveløsninger med følgende konsentrasjoner: 250 ng/mL, 500 ng/mL, 1 µg/mL og 2,5 µg/mL. Urin 1 ble benyttet i forsøket og linearitetskurvene er vist i figur 6.21.



Figur 6.21: Linearitet i urin. $n=4$, 10 V, 5 min, 1050 rpm.

Resultatet gir korrelasjonskoeffisienter som vist i tabell 6.20.

Tabell 6.20: Korrelasjonskoeffisienter ved linearitet i urin

	r^2
Petidin	0,9984
Nortriptylin	0,994
Metadon	0,9982
Haloperidol	0,9985
Loperamid	0,9988

Det er tidligere nevnt at det er anbefalt at r^2 skal ha en verdi på minst 0,999. Tabellen viser at r^2 ligger i området 0,9982 – 0,9988, og dette ansees som akseptabelt i denne sammenhengen. Det kan dermed konkluderes med at det er en lineær sammenheng mellom toppareal og konsentrasjon av modellsubstansene i urin i konsentrasjonsområdet 0,250 – 2,5 µg/mL.

6.3.3 Morsmelk

Morsmelk er et fettrikt matris som også inneholder proteiner og karbohydrater. Sammensetning av og konsentrasjon av fett i morsmelk varierer mye. Denne variasjonen sees mellom ulike kvinner men også mellom start og slutt av en amming. Det er særlig fettinnholdet som øker mot slutten av en amming. Legemidler moren tar vil få en fordeling over i morsmelken. Noen stoffer vil i stor grad bli bundet opp av fett, og denne bindingen kan tenkes å komplisere en ekstraksjon av disse stoffene fra morsmelk. Det har vært forsøkt LPME fra morsmelk spiket med basiske modellsustanser [24]. Den optimale LPME prosedyren man da fant frem til inkluderte et trinn for å bryte bindinger mellom fett i morsmelken og modellsustansene, deretter sentrifugering av prøven og så selve mikroekstraksjonen. Ekstraksjonsutbyttene som ble oppnådd var sammenliknbare med de fra rene vannprøver [24]. Det er tidligere aldri utført EME på morsmelkprøver og på bakgrunn av de forsøkene nevnt ovenfor og de andre forsøkene med biologiske prøver i denne oppgaven, ville man se på om lav – spennings EME lot seg utføre på spiket morsmelk.

200 μL morsmelk ble spiket med 250 μL prøveløsning (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) og fortynnet til 1 mL med acetatbuffer (pH 4). pH i donorfasene ble 4 og sikret dermed fullstendig ionisering av modellsustansene. Det ble utført ekstraksjoner på 5 ulike morsmelkprøver fra 2 ulike personer. 2 av prøvene var fra start av amming mens 2 var fra slutten av den samme ammingen. Resultatene er vist i tabell 6.21.

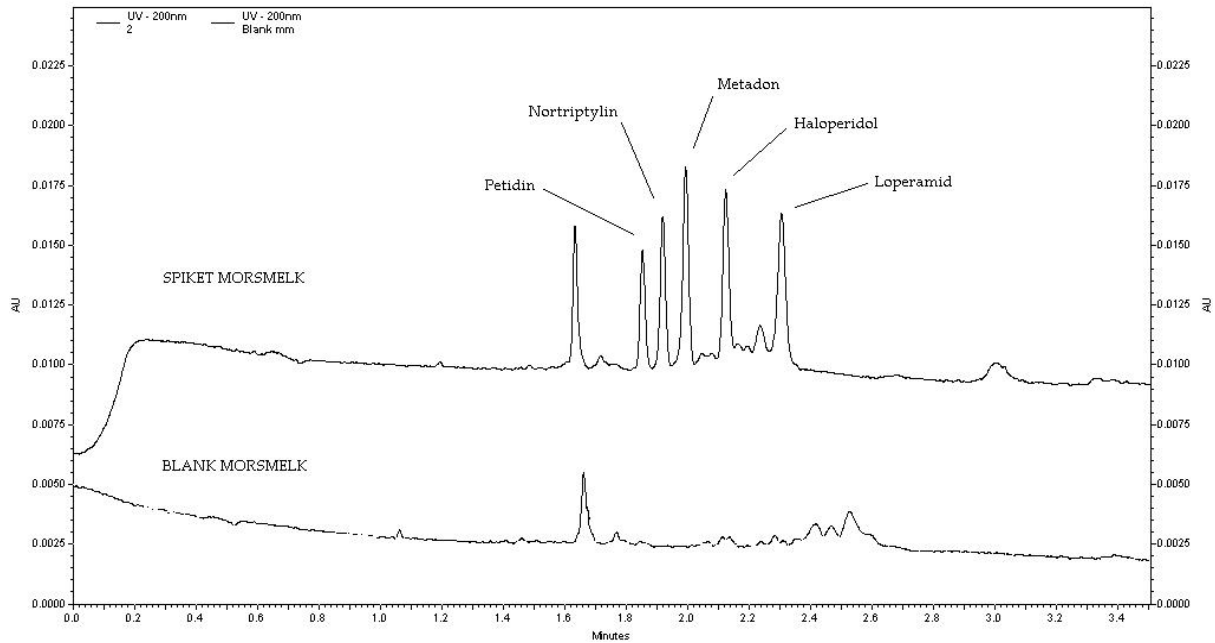
Tabell 6.19: Ekstraksjonsutbytter fra spiket morsmelk

	Utbytte (%) ^a					ST/SL
	Petidin	Nortriptylin	Metadon	Haloperidol	Loperamid	
Morsmelk 1 ^b	40	36	49	42	26	-
Morsmelk 2	39	44	55	49	49	ST
Morsmelk 3	40	38	51	45	40	SL
Morsmelk 4 ^c	35	38	45	47	41	ST
Morsmelk 5	35	33	47	47	37	SL

^a n=4, ^b n=7, ^c n=3, 10 V, 5 min, 1050 rpm. RSD < 21 %. ST = start av amming, SL = slutt av amming.

Resultatene viser at EME fungerer svært godt som en ekstraksjonsteknikk for morsmelk. Ekstraksjonsutbyttene fra de ulike morsmelkprøvene er ikke signifikant ulike, og det betyr at metoden ikke er sensitiv for endringer i sammensetningen av matriks. Et fortrinn ved å bruke EME på morsmelkprøver fremfor LPME er at ekstraksjonen kan utføres direkte på en bufret og fortynnet prøve uten sentrifugering som var nødvendig med LPME [24].

Figur 6.22 viser elektroferogram fra spiket og blank morsmelk. Også med dette matrikset blir endogene substanser effektivt selektert vekk i ekstraksjonen.



Figur 6.22: Elektroferogram fra spiket og blank morsmelk.

Forsøkene i dette kapitlet har vist at EME er en teknikk som fungerer godt på biologiske prøver. Resultatene fra ekstraksjoner fra ulike biologisk matriks og fra vandige prøver er oppsummert i tabell 6.22.

Tabell 6.22: Ekstraksjonsutbytter fra ulike prøvematriks

	Utbytte (%)			
	Vandig ^a	Plasma ^b	Urin ^c	Morsmelk ^d
Petidin	45	38	37	40
Nortriptylin	70	37	41	36
Metadon	84	44	48	49
Haloperidol	79	40	47	42
Loperamid	76	35	50	26

^a n=70, ^b n=12, ^c n=12, ^d n=7, 10 V, 5 min, 1050 rpm.

Tabellen viser at ekstraksjonsutbyttene fra biologiske prøver er nesten 50 % av utbyttene fra rene vandige prøver, men at variasjonene mellom de ulike matriksene ikke er store. Et unntak er igjen petidin som ekstraheres omtrent likt fra de 4 ulike matriksene. Dette kan bety at petidin er mindre sensitiv for andre komponenter i prøvematrikset enn de 4 andre modellsubstansene.

7 KONKLUSJON

Denne oppgaven har vist at EME fungerer godt som en metode for prøveopparbeidelse ved lave påsatte spenninger, og den har gitt ny og viktig kunnskap om metoden og bruksområder for den.

Forsøkene har vist bekreftet tidligere forskning som sier at den organiske fasen som benyttes i den organiske membranen har svært stor innvirkning på ekstraksjonsutbyttene. De beste ekstraksjonsutbyttene ved lav spenning ble oppnådd med IPNB som er en mindre hydrofob organisk fase enn NPOE, som har vist seg å være svært effektiv ved høye spenninger.

Ulike tilsetninger til den organiske fasen ble forsøkt men ingen ga signifikant bedre utbytter i forhold til ren IPNB. Variasjoner i spenning ble også forsøkt, og 10 V viste seg å gi optimal stoffluks gjennom den organiske membranen. Økning i ekstraksjonstid ga lavere utbytter enn de oppnådd ved 5 minutters ekstraksjonstid. Ved kortere tid ble det ikke oppnådd optimal stoffluks. Endringer i ionebalanse mellom donor- og akseptorfase ga heller ingen signifikant bedre resultater enn med lik molaritet av HCl i begge fasene. Med optimale betingelser lå ekstraksjonsutbyttene fra 45 % (petidin) til 84 % (metadon).

Det ble vist linearitet i IPNB ved 10 i konsentrasjonsområdet 0,250 – 2,5 µg/mL. r^2 – verdiene lå i området 0,992 – 1. Lineariteten ble vist å være uavhengig av ionebalansen mellom donor- og akseptorfasene.

For første gang har det blitt gjort systematiske forsøk med biologiske prøver der EME har blitt gjort med lav påsatt spenning. Det ble gjort forsøk med plasma, urin og morsmelk. Ulike fortyninger av det biologiske matrikset ble forsøkt, og med

acetatbuffer (pH 4) oppnådde man pH – kontroll og fullstendig ionisering av modellsubstansene ble sikret. Individuelle forskjeller i matriks ble vist å ikke ha noen innvirkning på ekstraksjonsutbyttene. Linearitet ble vist i plasma og urin i konsentrasjonsområdet 0,250 – 2,5 µg/mL, og r^2 – verdiene lå i området 0,994 – 0,9988.

8 REFERANSER

- [1] Psilliakis E, Kalogerakis N: *Developments in single – drop microextraction*. Trends in Analytical Chemistry 2002, **21**(1):53-63.
- [2] Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid – liquid – liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior ro capillary electrophoresis*. Analytical Chemistry 1999, **71**(14):2650-2656.
- [3] Ho TS, Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Recovery, enrichment and selectivity in liquid – phase microextraction. Comparison with conventional liquid – liquid extraction*. Journal of Chromatography A 2002, **963**(1-2):3-17.
- [4] Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Developments in hollow fibrebased, liquid – phase microextraction*. Trends in Analytical Chemistry 2004, **23**(1):1-10.
- [5] Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Bioanalysis of drugs by liquid – phase microextraction coupled to separation techniques*. Journal of Chromatography B 2004, **817**(1):3-12.
- [6] Halvorsen TG, Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Reduction of extraction times in liquid – phase microextraction*. Journal of Chromatography B 2001, **760**(2):219-226.
- [7] Kramer KE, Andrews ARJ: *Screening method for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in urine using hollow fiber membrane solvent microextraction with in-tube derivatization*. Journal of Chromatography B 2001, **760**(1):27-36.
- [8] Gjelstad A, Andersen TM, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields*. Journal of Chromatography A 2007, **1157**(1-2):38-45.
- [9] Ho TS, Vasskog T, Anderssen T, Jensen E, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *25,000 – fold pre-concentration in a single step with liquid – phase microextraction*. Analytica Chimica Acta 2007, **592**(1):1-8.

- [10] Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A 2006, **1109**(2):183-190.
- [11] Balchen M, Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of Chromatography A 2007, **1152**(1-2):220-225.
- [12] Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes - Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A 2006, **1124**(1-2):29-34.
- [13] Gjelstad A, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Simulation of flux during electro membrane extraction based on the Nernst – Planck equation*. Til trykking: Journal of Chromatography A.
- [14] Stichlmair J, Schmidt J, Proplesch R: *Electroextraction: A novel separation technique*. Chemical Engineering Science 1992, **47**(12):3015-3022.
- [15] Crossland H: *Hvordan man bruger statistik på kemiske bestemmelser*. Kemisk Laboratorium A, Danmarks Tekniske Universitet, 1985.
- [16] Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Legemiddelanalyse*. Fagbokforlaget, 2004.
- [17] Ho TS, Halvorsen TG, Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid – phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier – mediated transport*. Journal of Chromatography A 2003. **998**(1-2):61-72.
- [18] Ho TS, Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Experiences with carrier – mediated transport in liquid – phase microextraction*. Journal of Chromatographic Science 2006. **44**(6):308-316.
- [19] Balchen M: *Elektrokinetisk migrasjon av sure legemidler over en kunstig væskemembran*. 2006, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk Institutt, Universitetet i Oslo.
- [20] Rasmussen KE: *Farmasøytisk bioanalyse (PKA 345)*. 2000, Oslo, Norge: Unipub AS.

- [21] Felleskatalogen 2006. Fagbokforlaget, 2006.
- [22] Ho TS, Pedersen – Bjergaard S, Rasmussen KE: *Liquid – phase microextraction of protein – bound drugs under non – equilibrium conditions*. *Analyst* 2002, **127**(5):608-613.
- [23] Rasmussen KE: *Bioanalyse og validering av analysemetoder*. 2005, Oslo, Norge, Unipub AS.
- [24] Bjørhovde A, Halvorsen TG, Rasmussen KE, Pedersen – Bjergaard S: *Liquid – phase microextraction of drugs from human breast milk*. *Analytica Chimica Acta* 2003, **491**(2):155-161.