

# Karakterisering av væskemembraner til bruk i *“Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction”*

---

Navera Jahangir Ghauri



Faggruppen for legemiddelanalyse

Avdeling for Farmasøytisk Kjemi

Farmasøytisk Institutt

Det matematisk- naturvitenskapelige Fakultet

Universitet i Oslo

August 2014

# Karakterisering av væskemembraner til bruk i “*Parallel artificial liquid membrane extraction*”



**Navera Jahangir Ghauri**

Masteroppgaven ble gjennomført ved faggruppen for Legemiddelanalyse, avdeling for Farmasøytisk Kjemi, Farmasøytisk Institutt ved Universitet i Oslo perioden august 2013 til juli 2014

Veiledere: Professor Stig Pedersen-Bjergaard  
Førsteamanuensis Astrid Gjelstad

# Innholdsfortegnelse

<b>1. Sammendrag</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Forkortelser</b> .....	<b>7</b>
<b>3 Innledning</b> .....	<b>9</b>
3.1 Målsetting .....	13
<b>4. Teori</b> .....	<b>14</b>
4.1 Oppsett PALME.....	15
4.2 Fordeler ved PALME og HF-LPME.....	16
4.3 Massetransport .....	17
4.4 Organisk fase .....	19
4.5 Ekstraksjonstid.....	20
4.6 Kapillærelektroforese (CE).....	21
<b>5 Eksperimentelt</b> .....	<b>23</b>
5.1 Modellsustanser .....	23
5.2 Kjemikalier .....	25
5.3 Instrument og betingelser.....	27
5.3.1 CE .....	27
5.4 Tillaging av løsninger .....	28
5.4.1 Stamløsning av upolare legemidler .....	28
5.4.2 Stamløsning av polare legemidler .....	28
5.4.3 Standardløsning.....	29
5.4.4 Prøveløsning.....	29
5.4.5 Separasjonsbuffer (fosfatbuffer).....	29
5.4.6 Akseptorløsning .....	29
5.4.7 CE standardløsning .....	29
5.4.8 Natriumhydroksid løsning .....	30
6.1 Parallel Artificial Liquid Membrane Exctraction .....	30
6.2 Veieforsøk av fordampning av væskemembranen.....	33
6.3 Stabilitetsforsøk av væskemembranen.....	33
6.4 Påsettingsforsøk av kunstig væskemembran .....	33
6.5 Beregning av utbytte .....	34

6.6 Q-Test .....	34
6.7 T-test .....	35
<b>7. Resultater og diskusjon .....</b>	<b>36</b>
7.1 Innledende forsøk.....	36
7.2 Ekstraksjon med PALME .....	38
7.2.1 Ekstraksjon med ulike væskemembraner .....	38
7.2.2 Ekstraksjon av upolare analytter.....	39
7.2.3 Ekstraksjon av polare analytter.....	42
7.3 Veieforsøk med væskemembranen .....	48
7.4 Stabilitet av væskemembranen .....	49
7.5 Påsetting av væskemembran .....	51
<b>8. Konklusjon.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Referanseliste.....</b>	<b>53</b>

## FORORD

Jeg ønsker å rette en stor takk til min hovedveileder Stig Pedersen Bjergaard for utmerket veiledning og god hjelp gjennom hele hovedfaget. Jeg vil også takke min hovedveileder Astrid Gjelstad for praktisk hjelp og tips med laboratoriet arbeidet. Jeg er takknemlig til dere begge for at dere har vært tilgjengelige og alltid har besvart spørsmål vedrørende oppgaven, og ikke minst for den tålmodighet dere har vist gjennom dette løpet.

Jeg vil også takke mine medstudenter Audun, Kristine og Turgay for gode samtaler og stemning på hovedfagskontoret. Takk til Lars Erik for hjelp hver gang jeg har spurt, og resten av analyseavdelingen ved farmasøytisk institutt for et godt arbeidsmiljø.

Til slutt vil jeg takke min familie for all støtte og oppmuntring jeg har fått! Det skal jeg verdsette for alltid.

Oslo, August 2014

---

Navera Jahangir Ghauri

## 1. Sammendrag

I dette prosjektet har det blitt arbeidet med å ekstrahere basiske legemiddelanalytter basert på væske- væske-væske mikroekstraksjon. Arbeidet har tatt utgangspunktet i en helt nytt prøveopparbeidelsesmetode "Parallel Artificial Liquid Membrane Exctraction" (PALME), en form for tre-fase mikroekstraksjon. Det ble undersøkt om det var mulig å foreta en selektiv ekstraksjon av polare og upolare analytter ved å teste ulike kunstige væskemembraner. Hovedfokus har vært å selektere væskemembraner som har tendens til å gi optimalt ekstraksjonsutbytte og samtidig holde membranen intakt og anvendelig etter impregnering over en viss tid. Hvordan påsette organisk løsemiddel på membranen med hensyn til automatisering av teknikken i fremtiden, har også vært et viktig forhold. 10 modellanalytter ble ekstrahert fra 200 µl vandig basisk prøveløsning (donorfase), bestående av 10 mM NaOH, over en organisk væskemembran (supported liquid membrane, SLM), og inn i en sur akseptorløsning (akseptorfase). Væskemembranen bestod av polypropylenmembran, hvor membranen ble impregnert med ulike organiske løsemidler. I det endelige oppsettet ble det benyttet 200 µl prøveløsning, 50 µl 10 mM NaOH, 50 µl 10 mM HCl (akseptorfase) og 2,5 µl væskemembran. Ekstraktet ble deretter analysert ved kapillærelektroforese (CE).

Løsemidler med kokepunkt over 220 °C ble funnet å være mest stabile da tap av løsemiddelet var mindre for disse. Utbytte av ekstraksjonen etter lagring på 0,1 og 3 timer var høyest for løsemiddel med lav flyktighet og høyt kokepunkt. Membranen anvendt under 1 time etter impregnering ga høyt utbytte og lave RSD verdier både for løsemidler med kokepunkt over og litt under 200 °C. Generelt viste det seg at væskemembranen bør brukes kort tid etter impregnering med løsemiddelet. Det ble sett ingen signifikant forskjell i ekstraksjonsutbyttene mellom fjerning og ikke fjerning av løsemiddelet fra membranen, noe som kan lette automatiseringsprosessen i fremtiden. Arbeidet har også vist at valg av løsemiddel bør være relatert til analyttens strukturelle egenskaper. Løsemidler med relativt sterke protonakseptor- eller dipol-egenskaper som tilhører gruppe I (alifatiske etere og aminer), V (alkoholer), II (ester og ketoner) og gruppe IV (aromatisk etere, hydrokarboner og halogenerte forbindelser) av Kamlet og Taft klassifisering, ble funnet å være de beste alternativene for basiske polare og upolare legemidler. Løsemidler med polar karakter ga noe høyere utbytte av polare analytter, og upolare løsemidler ga noe høyere utbytte for upolare analytter. Selektiviteten av løsemiddel var mindre viktig for analytter med log  $P$  -verdier mellom 2-4, men valget av løsemiddel ble kritisk for analytter med log  $P$  under 2 og log  $P$  over 4.

## 2. Forkortelser

***PALME*** *Parallel artificial liquid membrane extraction*

***LLE*** *Væske-væskeekstraksjon  
(Liquid-liquid extraction)*

***SPE*** *Fast-faseekstraksjon  
(Solid phase extraction)*

***LPME*** *Væskefase mikroekstraksjon  
(Liquid phase microextraction)*

***HF-LPME*** *Hulfiber væskefase mikroekstraksjon  
(Hollowfiber liquid phase microextraction)*

***EME*** *Elektromembranekstraksjon  
(Electromembrane extraction)*

***NPOE*** *Nitrofenyloktyleter*

***CE*** *Kapillærelektroforese*

***HPLC*** *Væskerkromatografi*

***LC- MS*** *Væskerkromatografi med massespektrometer  
som deteksjon*

***UV*** *Ultrafiolet*

***$\mu\text{m}$***                       ***Mikrometer***

***ml***                              ***Milliliter***

***mm***                              ***Millimeter***

***mM***                              ***Millimolar***

***$\mu\text{g}$***                               ***Mikrogram***

***g***                                  ***Gram***

***RSD***                              ***Relativt standardavvik***

***Rpm***                              ***Revolutions per minute***

***psi***                                  ***Pounds per square inch***

***SLM***                              ***Organisk væskemembran  
(supported liquid membrane)***

---



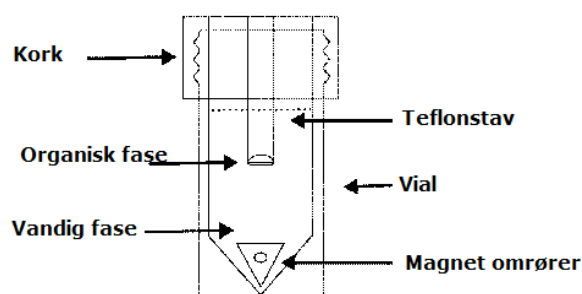
### 3 Innledning

Man har ofte begrenset med prøvevolum når en skal foreta legemiddelanalyser, som for eksempel analyser av legemidler i en bloddråpe, i svette eller i spyttrester. Dessuten har biologiske prøver en kompleks sammensetning, noe som gjør det problematisk å injisere prøven direkte i analyseinstrumenter. Det er derfor viktig med gode prøveopparbeidelsesteknikker for små mengder av tilgjengelig prøvemateriale. I tillegg er lav legemiddelkonsentrasjon i biologiske væsker en utfordring. Nødvendigheten av å oppkonsentrere og opprense analytten der det er påkrevet, blir dermed stor.

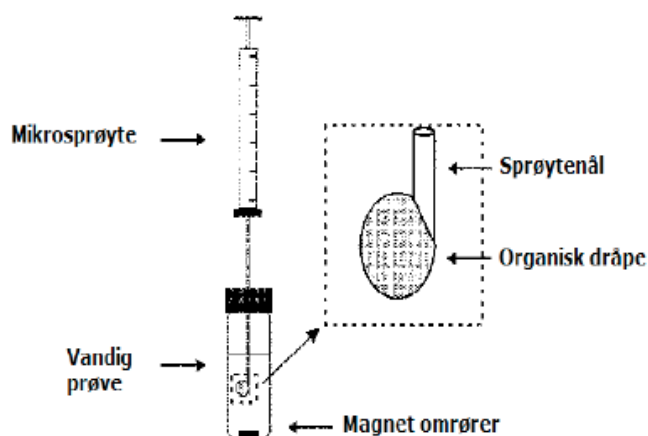
Tradisjonelt har væske-væske ekstraksjon (Liquid-Liquid Extraction, LLE) og fast-faseekstraksjon (Solid Phase Extraction, SPE) vært viktige og robuste teknikker innen legemiddelanalyse. LLE er basert på fordeling av et stoff mellom en vandig løsning- og et organisk løsemiddel som ikke er blandbare med hverandre. Basis for SPE derimot, er stoffets evne til å fordele seg mellom et fast stoff og en væske. Selv om metodene har vært vel etablerte, er de tidskrevende, og forbruket av helseskadelige organiske løsemidler er høyt. LLE er i tillegg vanskelig å automatisere. Dette har ført til økt fokus på utvikling av nye, forbedrede miniaturiserte ekstraksjonsteknikker som kan gi selektiv isolasjon av analytten man er interessert i, og dermed gi rene ekstrakter. I tillegg kan mikroekstraksjons teknikker lette automatiseringen og redusere ekstraksjonstiden og forbruket av organiske løsemidler.

Et av de første arbeidene med miniaturisering av LLE i analytisk kjemi ble introdusert i 1996 [1]. Singeldråpe væskefase mikroekstraksjonen (Liquid Phase Microextraction, LPME) i et to-fase system ble gjennomført med en dråpe organisk løsemiddel hengende fra tuppen på en mikrosprøyte, plassert i en vandig løsning. Analyttene i den vandige løsningen ble ekstrahert over i den organiske dråpen og direkte injisert i en gasskromatograf (GC) [2,3]. Alternativt ble også LPME utført i et tre-fase system der ekstraktet var direkte kompatibel med væskrokromatografi (HPLC) eller kapillærelektroforese (CE). I en tre-fase-ekstraksjon ble analyttene ekstrahert fra en vandig løsning, gjennom et tynt lag av organisk løsemiddel, og videre inn i en vandig mikrodråpe på spissen av sprøyten. Prosessen ble drevet via passiv diffusjon [4]. Oppsett av singeldråpe LPME som ble introdusert for første gang, er illustrert i figur 1, og den utviklede metoden av oppsettet er presentert i figur 2.

LPME teknikken var lovende, og ga muligheten til å jobbe med organiske løsemidler på mikronivå. Dette la forholdene til rette for et mindre toksisk og helseskadelig arbeidsmiljø. I tillegg ga et tre-fase system god oppkonsentrering og rene ekstrakter. Til tross for meget gunstige egenskaper var ikke singeldråpe LPME særlig robust. Stabiliteten på dråpen var et problem, da dråpen lett kunne falle av fra spissen på mikrosprøyten under ekstraksjonen. Dette spesielt når det var ønskelig å omrøre løsningen for å fremskynde ekstraksjonsprosessen [4]. I tillegg kunne for eksempel biologiske prøver som plasma, emulgere små mengder av det organiske løsemiddelet, og dermed påvirke stabiliteten til dråpen [5]. Metoden benyttes svært sjelden i legemiddelanalyse i dag.



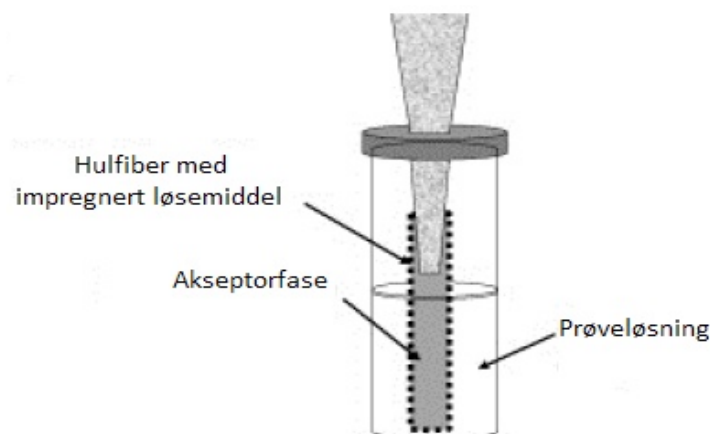
Figur 1. av singeldråpe mikroekstraksjonssystem som ble introdusert av Jeannot og Cantwell i 1996. Figuren er hentet fra [1].



Figur 2. Skjematisk presentasjon av singeldråpe mikroekstraksjonssystem, introdusert av Jeannot og Cantwell i 1997. Organisk mikrodråpe henger på tuppen av en mikrosprøyte. Figuren er hentet fra [6].

For å bedre stabiliteten og påliteligheten av singeldråpe ekstraksjonen, introduserte Pedersen-Bjergaard og Rasmussen i 1999 et mer robust konsept for LPME. Dette konseptet var basert på en porøs hulfiber av polypropylen (Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HF-LPME) [7,8]. Analyttene ble ekstrahert fra en vandig prøveløsning gjennom en tynn kunstig organisk væskemembran, og inn i en akseptorløsning på innsiden av en hulfiber [8]. Med dette kom ikke mikroekstraktet i direkte kontakt med prøveløsningen, og kunne derfor vibreres og omrøres uten at mikroekstraktet gikk tapt [5,8]. Et enkelt oppsett som er beskrevet i en rekke publiserte artikler er vist i figur 3.

HF-LPME har mange fordeler fremfor de mer etablerte metodene, og siden de første publikasjonene med HF-LPME har mange forskningsgrupper vist sin interesse for teknikken. Selv om HF-LPME gir god oppkonsentrering, opprensning og tilfredstillende utbytter av kompliserte biologiske prøver, er dette en relativ tidskrevende teknikk, med ekstraksjonstider i intervallet mellom 15-60 minutter [9]. Interessen for HF-LPME er fortsatt betydelig, men komplisert og ikke kommersielt tilgjengelig utstyr gjør det vanskelig å effektivisere og automatisere teknikken. Videre har det vært vanskelig å utføre opparbeidelsen i multibrønnsformat.

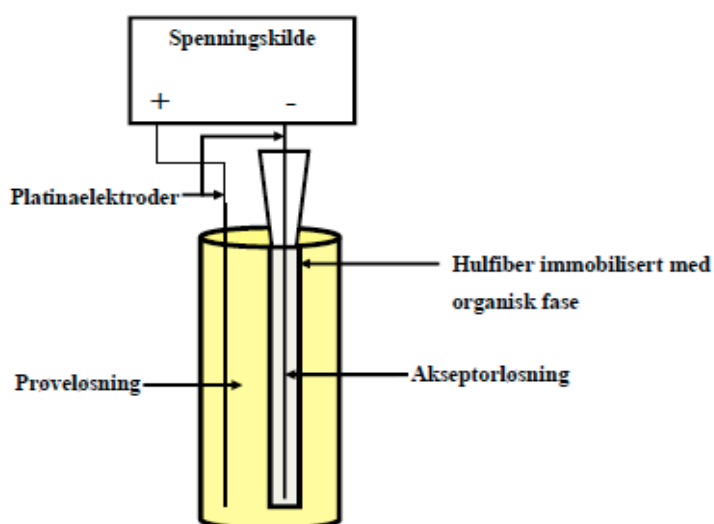


*Figur 3. Illustrasjon av hulfiber basert væskefasemikroekstraksjon. Figuren er hentet fra [9].*

I 2006 ble en ny prøveoppbeidelsesteknikk basert på et tre-fase system omtalt i analytisk kjemi [10]. Teknikken ble kjent som elektromembranekstraksjon (EME). Oppsettet er illustrert i figur 4. EME hadde tilnærmet samme oppsett som HF-LPME, men i tillegg var det koblet inn to

elektroder til en spenningskilde. Elektromigrasjon av legemidler over en kunstig væskemembran var dermed ikke bare avhengig av fordelingskoeffisienten, da også spenningen var en avgjørende drivkraft for massetransporten [10,11].

Spenningen drev de ladete analyttene fra prøveløsningen over den kunstige væskemembranen og inn i akseptorløsningen. Ekstraksjonstiden var betydelig redusert, og EME viste seg å være en rask ekstraksjonsmetode sammenlignet med eksisterende teknikker [10,11,12]. EME har siden vist stort potensiale for anvendelse innen legemiddelanalyse, og interessen for teknikken har vært betydelig på grunn av effektiv og relativt rask ekstraksjon. Foreløpig har EME ikke oppnådd fremgang på lik linje som de tradisjonelle opparbeidelsesmetodene [13]. Grunnen til dette kan være komplisert oppsett og mangel på kommersielt utstyr.



Figur 4. viser en enkel oppsett for EME. Figuren er hentet fra [14].

Internasjonalt sett økte interessen rundt membran basert væskefase-mikroekstraksjon som resulterte i et nytt konsept for LLE av analytter fra små volumer av biologiske væsker, introdusert i 2013. Den nye miniaturiserte væskefase ekstraksjonen er en videreutviklet teknikk av HF-LPME og har fått navnet, *Parallel artificial liquid membrane extraction* (PALME). PALME har tilnærmet samme prinsipp som HF-LPME, men med vesentlig forskjell: PALME gjennomføres i enkelt kommersielt tilgjengelig 96 brønnsplater med flat membran [15]. Per dags dato er det kun én publisering som omtaler PALME i litteraturen.

PALME er benyttet til ekstraksjon av legemidler i plasma og vandige prøver med betydelig lavere ekstraksjonstid enn HF-LPME, og kan anvendes til ekstraksjon av legemidler som er basiske polare - eller upolare [15]. Ettersom miniatyrisering er i fokus, kan PALME være en interessant miniatyrisert tilnærming til prøveoppbehandling som lett kan integreres med HPLC og CE. Teknikken vil lettere automatiseres i motsetning til HF-LPME, da utstyret og oppsettet er enkel for PALME. Det antas at tiden fra å utvikle og optimalisere PALME mot full automatisering, vil være kort.

### 3.1 Målsetting

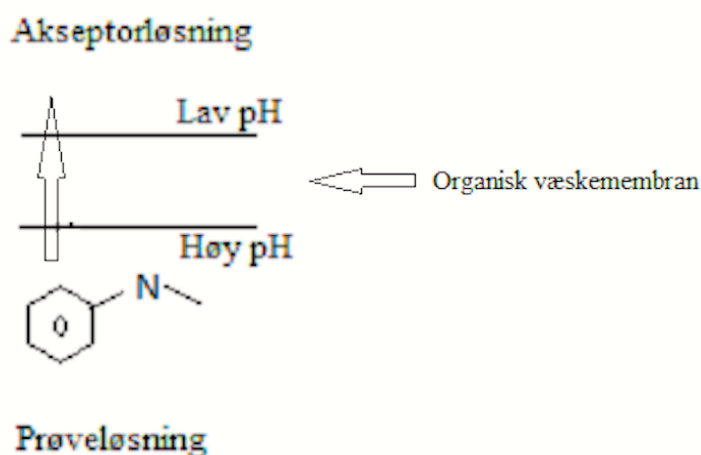
Dette arbeidet vil ta for seg praktisk bruk av PALME med tanke på blant annet stabiliteten av den kunstige væskemembran etter å ha påsatt organisk løsemiddel. Siden kun et lite utvalg av organiske løsemidler er testet i PALME, vil dette arbeidet også belyse hvilke organiske løsemidler med forskjellige fysikalske og kjemiske egenskaper, og deres evne til å ekstrahere, vil være best egnet som kunstig væskemembran. Hovedmålet for oppgaven har vært å optimalisere teknikken med fokus på:

- Selektere frem organiske løsemidler egnet for kunstig væskemembran i PALME
  - For upolare basiske legemidler
  - For polare basiske legemidler
- Teste stabiliteten til den kunstige væskemembranen under eksponering av luft i ulike tidsintervaller
- Teste hvordan organisk løsemiddel skal påsettes på polypropylen membranen

Slike praktiske anbefalinger kan komme til nytte i forbindelse med arbeid rundt automatisering av teknikken i fremtiden, og generere grunnleggende vitenskapelig informasjon om PALME av analytter med ulik polaritet. Et håp er å demonstrere hvordan PALME med enkel oppsett og utstyr, kan bli brukt på lik linje med viktige kommersielle prøveoppbeholdelsesmetoder.

## 4. Teori

PALME er en videreføring av HF-LPME, som er mye omtalt i publikasjoner utført av ulike forskningsgrupper siden introduksjonen på slutten av 1990- tallet. Prinsippet for teknikken er å ekstrahere ønskede analytter fra en prøveløsning (donorfase) gjennom en organisk fase (SLM), og videre til akseptorløsning (akseptorfase). Figur 5 viser ekstraksjon av en basisk analytt. pH i prøveløsningen blir justert til basisk for å holde analyttene i uladet form, mens akseptorløsningen er sur. Oppsettet av HF-LPME systemet er anvist i figur 3. Prøveløsning fylles i en vial med en skrukork med silikonseptum. En porøs polypropylen hulfiber blir festet til en pipettespiss. Pipettespissen og hulfiberen blir plassert i vialen gjennom hull i silikonseptumet. Organisk løsemiddel immobiliseres i hulfiberen via kapillærekrefter. Deretter blir en akseptorløsning fylt på innsiden av lumen til hulfiberet. Ekstraksjonsprosessen er styrt av passiv diffusjon. Analyttene i deres uladet form blir ekstrahert fra prøveløsningen til SLM, og videre til akseptorløsning. I akseptorløsningen blir analyttene ladet, hvilket hindrer dem i å bli tilbakeekstrahert til SLM [16].

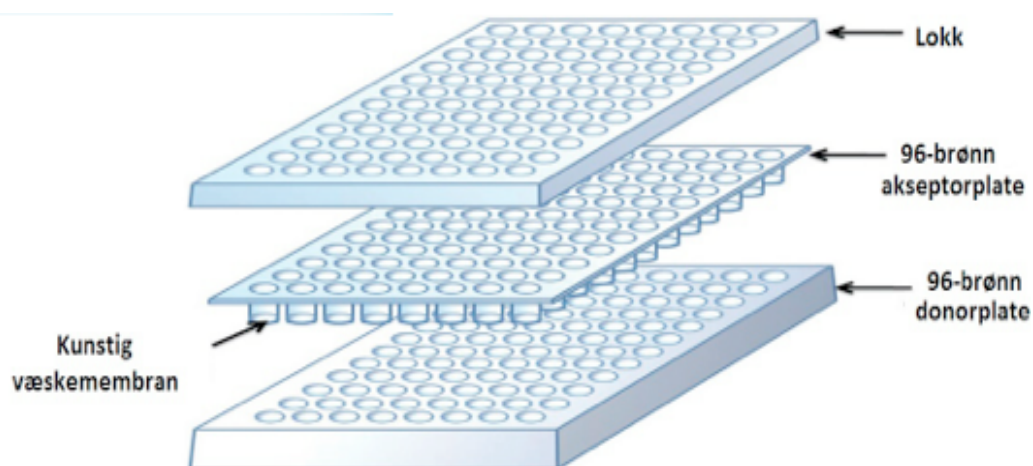


Figur 5. Enkel Prinsippskisse for ekstraksjon i HF-LPME.

Prinsippet for HF-LPME har dannet grunnlag for ekstraksjon i PALME. Den første publikasjonen med PALME omhandlet testing og optimalisering av teknikken med hensyn på ekstraksjonstid, volum av prøveløsningen og væskemembranen, og bruk av forskjellige væskemembraner. Den korte ekstraksjonstiden og det relativt enkle oppsettet, samt det lave

forbruket av løsemiddelet, gir håp om å integrere PALME til en etablert og betydelig prøveopparbeidelsesmetode innen legemiddelanalyse [15].

## 4.1 Oppsett PALME



Figur 6. Prinsippskisse av PALME. Figuren er hentet fra [15].

Platene er kommersielt tilgjengelige, og er i utgangspunktet designet for filtrering, men har vist seg å være gunstig utstyr til ekstraksjon. Oppsettet av PALME er enkelt, og består av tre viktige elementer (se figur 6). Bunn-elementet er en donorplate bestående av 96 brønner med en brønndiameter på 6 mm. Små volumer av prøveløsning typisk mellom 250 – 450  $\mu\text{l}$  fylles i de små brønnene [15]. Over bunnplaten plasseres en akseptorplate med 96 flate membraner av porøst materiale med en tykkelse på 100  $\mu\text{m}$  på bunnen av 96 brønner. Over hvert membran er det et lite væskeresservoar. Før ekstraksjonen impregneres hver membran med 2-3  $\mu\text{l}$  organisk løsemiddel. Dette organiske løsemiddelet er ikke blandbart med vann, og danner en tynn kunstig væskemembran. Ved hjelp av kapillærkrefter immobiliseres løsemiddelet i porene til polypropylen membranen [15]. Over den kunstige væskemembranen fylles typisk 50  $\mu\text{l}$  av en vandig akseptorløsning. Bunnplaten og akseptorplaten trykkes sammen, og det settes et lokk på slutten for å hindre fordampning, og for å få et lukket systemet, slik at løsningene ikke lekker ut ved agitasjon.

Kommersielt består akseptorplaten av polyvinylidenefluorid (PVDF) membran. Men eksperimenter med PVDF membran har vist at noen legemiddelsubstanser har en tendens til å danne uspesifikke bindinger til mebranen, og dermed påvirke analyseresultatene. Membranen ble av den grunn erstattet med en polypropylen membran [15]. Tidligere erfaring med polypropylen ga grunnlaget for å bruke polypropylen også i dette konseptet [17,8]. En polypropylen membran er kompatibel med et mangfold av organiske løsemidler, og holder seg stabil ved impregnering [8]. Den er lett tilgjengelig på markedet, billig og kan kasseres etter engangsbruk. Det betyr at man eliminerer også problemer med carry-over effekt [18].

PALME er en miniatyrisert opparbeidelsesmetode der analytter man er interessert i ekstraheres fra en prøveløsning over en kunstig væskemembran, og videre til en akseptorløsning ved hjelp av en pH-gradient på samme måte som HF-LPME. Akseptorfase benyttes videre til analyse i væskrokromatografi (LC-MS/HPLC) eller CE. Basis for ekstraksjonen er analyttens evne til å fordele seg mellom de ulike fasene. Dette forutsetter at løseligheten av analyttene reduseres i prøveløsningen, og økes i akseptorløsningen [19].

For å utføre ekstraksjonen, fylles brønnene med prøveløsning. Organisk løsemiddel påsettes membranen, og ved hjelp av kapillærkrefter immobiliseres løsemiddelet i porene til membranen [15]. Overskuddet av organisk fase fjernes med medisinsk tørkepapir. Deretter fylles den vandige akseptorløsningen over den kunstige væskemembranen. Platene trykkes sammen som en ”sandwich” , og settes på et risteapparat under ekstraksjonen for å få en optimal effektivitet. Vibreringen gjør at analyttene kommer i bedre kontakt med væskemembranen, og ekstraksjonsprosessen inntreer raskere [5]. Den reduserte løseligheten av analytten i basisk prøveløsning (donorfase), og korresponderende høy løselighet i akseptorløsning (akseptorfase), gjør at analytten overføres fra prøveløsningen gjennom kunstig væskemembran og videre til akseptorløsningen.



## 4.2 Fordeler ved PALME og HF-LPME

Fordelene ved bruk av HF-LPME fremfor den tradisjonelle opparbeidelsesmetoden LLE, er flere. HF-LPME har fått stor interesse i legemiddelanalyse på grunn av mindre løsemiddelforbruk ved fukting av den polymere membranen i forkant av ekstraksjonen. Dette er gunstig med tanke på reduksjon av toksisitet for personell som arbeider med helsefarlige løsemidler. I tillegg er det miljøvennlig, og bedre av økonomiske hensyn [19].

Videre er bruken av prøvevolum (50 µl -1 ml) betraktelig høyere enn volum av akseptorfasen (2-30 µl). På grunn av store forskjeller i volum oppnås det høy oppkonsentreringsfaktor uten å ha behov for avdamping eller re-løsning av stoffene [8]. Forskjell i pH gradient mellom prøveløsning og akseptorfasen bidrar til en effektiv prosess med høy selektivitet og god opprensning. HF-LPME er en gunstig teknikk å benytte for å isolere, opprense og oppkonsetrere analytter fra kompliserte matrikser som for eksempel biologiske prøver. Ulempen ved teknikken er i midlertid relativ lang ekstraksjonstid, og komplisert utstyr som har vært vanskelig å automatisere.

Ved PALME er det ansett flere fordeler enn de som er nevnt ovenfor. En av de viktigste fordelene med PALME er den relative korte ekstraksjonstiden (15 min). Av den grunn tar det mindre tid å oppnå ekstraksjonslikevekt ved PALME sammenlignet med HF-LPME (45-60 min). I tillegg til dette har membrantykkelsen på den flate membranen i PALME blitt betraktelig redusert, noe som bidrar til raskere massetransport over membranen til tross for mindre overflateareal (0,3 cm<sup>2</sup>) i forhold til HF-LPME, med en overflatearealet på (1,5 cm<sup>2</sup>). Den lave ekstraksjonstiden og de høye ekstraksjonsutbyttene er derfor en direkte konsekvens av reduksjon i membrantykkelsen i PALME [15]. En ytterligere fordel ved PALME er at det er lettere å implementere meget tynne membraner i en 96-brønnsplate. Dette gjør PALME til en mer attraktiv og lovende teknikk innen legemiddelanalyse.

## 4.3 Massetransport

Massetransport av analyttene over membranen er det hastighetsbestemmende trinnet i ekstraksjonsprosessen. Tykkelsen på membranen er en avgjørende faktor som også påvirker massetransporten [15,20]. Massetransport i HF-LPME og dermed også i PALME er

basert på passiv diffusjon, og er avhengig av analyttens fordelingskoeffisient mellom prøveløsningen, væskemembranen og akseptorløsningen. Det betyr at systemet krever høy fordelingskoeffisient fra prøveløsningen og til akseptorløsningen for å få en tilfredstillende ekstraksjon. Prosessen er en likevektsreaksjon og konsentrasjonen av analytten i akseptorfase vil øke helt til det oppnås likevekt [19,21]. Fordelingen av analytten i systemet kan illustreres slik [5,22] :



Fordelingskoeffisienten av analytten kan beregnes etter følgende likninger [5,22] :

$$\mathbf{K}_{\text{org-don}} = \frac{C_{\text{eq,org}}}{C_{\text{eq,don}}} \quad (2)$$

$$\mathbf{K}_{\text{aks-org}} = \frac{C_{\text{eq,aks}}}{C_{\text{eq,org}}} \quad (3)$$

$$\mathbf{K}_{\text{aks-don}} = \frac{C_{\text{eq,aks}}}{C_{\text{eq,don}}} = \mathbf{K}_{\text{org-don}} \times \mathbf{K}_{\text{org-aks}} \quad (4)$$

En høy verdi av  $k_{\text{org-don}}$  gir høy grad av fordeling av analyttene fra prøven til væskemembran, og en høy verdi av  $k_{\text{aks-org}}$  gjør at analyttene ekstraheres fra væskemembranen, og videre til akseptorfase [22]. Masseoverføring i de tre fasene fremmes av optimale pH-betingelser på hver side av den kunstige væskemembranen. pH i prøveløsningen justeres for å undertrykke analyttioniseringen, mens pH i akseptorløsningen justeres for å sikre fullstendig ionisering av analyttene [23]. Løseligheten i den vandige prøveløsningen reduseres kraftig når ioniseringen undertrykkes, og analyttene vil derfor ekstraheres lett over i den kunstige væskemembranen. Videre vil ioniseringen i akseptorfase gjøre at analyttene blir mer vannløselig og mindre løselige i væskemembranen. Dermed hindrer man tilbakeekstraksjon av analyttene til væskemembranen. For basiske forbindelser skal pH-verdien i prøveløsningen være minst 3 pH-enheter høyere enn basens pKa verdi (se figur 5). I akseptorfase bør verdien være minst 3 pH-

enheter lavere enn pKa-verdien [19]. For sure analytter justeres pH i donorfasen ned til det sure området og akseptorløsningen gjøres basisk. Teorien diskutert ovenfor er gjort i forsøk med HF-LPME, men gjelder også for ekstraksjoner i PALME.

Ekstraksjonsprosessen for tre-fase HF-LPME er basert på passiv diffusjon av analyttene med høye fordelingskoeffisienter. Legemidler med svært polar karakter ( $\log P < 1$ ) og lav fordelingskoeffisient, kan hindre analytten i å bli ekstrahert i et system basert alene på passiv diffusjon. Løseligheten for disse analyttene er størst i et vandig miljø, og diffusjon til væskemembranen vil derfor være begrenset [5]. Fordelingen vil være forskjøvet mot venstre i likning (1), og ekstraksjonen vil ikke lenger drives av fordelingskoeffisienten. I tilfeller hvor det har vært ønskelig å ekstrahere svært polare stoffer har man i HF-LPME ekstrahert analyttene ved hjelp av aktiv transport hvor man tilsetter bæremolekyler (carrier) i prøveløsningen [5,19]. Bæremolekylene danner hydrofobe ionepar med analyttene. Dette gjør at løseligheten i væskemembranen øker, og likevekten forskyves mot høyre i likningen (1). pH justeres i de to vandige fasene slik at analyttene og bæremolekylene er i ionisert form i prøveløsningen og kun analyttene er ionisert i akseptorløsningen. Ekstraksjon basert på tilsetning av bæremolekyler kan også kanskje være aktuelt for analyse av svært polare analytter ( $\log P < 1$ ) i PALME.

## 4.4 Organisk fase

Valg av den kunstige væskemembranen (organisk fase) er også en avgjørende faktor for massetransport av analyttene. Diffusjon av analyttene fra væskemembranen og inn i akseptorfasen blir avgjort av egenskapen til den organiske fasen, som blir immobilisert i membranens porer [15]. Analyttene bør ekstraheres raskt og effektivt inn i væskemembranen og bli transportert like effektivt til akseptorløsningen uten å bli fanget i den kunstige væskemembranen. Å finne et optimalt løsemiddel for anvendelse i ekstraksjonen er et viktig trinn under metodeutviklingen.

Ved valg av løsemiddel for en ekstraksjon er det viktig å fokusere på egenskapene til løsemiddelet. Egenskaper som er av betydning og viktig å betrakte er blant annet viskositet og polaritet. Løsemidler med lav viskositet foretrekkes, da høy viskositet på et løsemiddel kan føre til sakte diffusjon av analytten fra væskemembranen til akseptorløsningen.

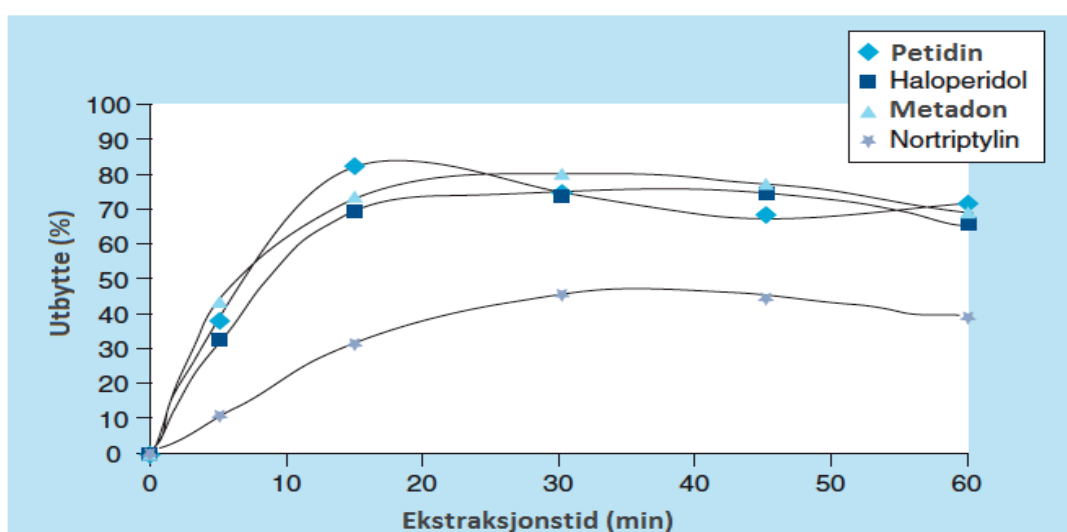
Polariteten på et løsemiddel er derimot viktig for interaksjoner med analytten. Polariteten sier noe om løsemidlets evne til å delta i polare interaksjoner som hydrogenbindingsinteraksjoner og dipolinteraksjoner. Andre interaksjoner som Van der Waals krefter og ioniske interaksjoner kan også finne sted. Hydrogenbindinger gir de sterkeste interaksjonene av et stoff. Basert på diskusjonen ovenfor bør ekstraksjonsmiddelet (løsemiddelet) for en bestemt analytt i prinsippet velges basert på den molekylære strukturen til analytten. Kunnskap om molekylære interaksjoner kan brukes for å forutsi den beste typen løsemiddel for applikasjonen i PALME. Valg av løsemiddel gjort på bakgrunn av disse opplysningene kan gi høy fordelingskoeffisient, og diffusjonen av analytten fra prøveløsningen og inn i væskemembranen vil kunne foregå raskt.

Flyktighet og løselighet er også avgjørende parametere ved valg av løsemiddel til tre-fase mikroekstraksjon. Løsemidler med lavt kokepunkt og dermed høy flyktighet kan gi ustabil væskemembran, og påvirke analyseresultatene. Fordampning av et løsemiddel med høyt kokepunkt derimot er mindre både under og etter ekstraksjon. Det er av den grunn fordelaktig å benytte løsemidler med høyt kokepunkt for å bevare stabiliteten til væskemembranen. En vesentlig utfordring ligger i at væskemembranen kan delvis lekke ut i de vandige fasene under ekstraksjonen. Løsemiddelet som velges bør ha lav vannløselighet for å unngå nettopp at løsemiddelet blander seg i prøveløsningen (donorfase) eller akseptorløsningen (akseptorfase) [17]. Til slutt er det like viktig å vurdere løsemidlets toksiske egenskaper. Det organiske løsemiddelet bør være akseptert for anvendelse når det gjelder sikkerhet og miljømessig aspekter. Generelt er det viktig å unngå bruk av løsemidler som er kreftfremkallende eller svært toksiske.

I en rekke studier med HF-LPME har forskjellige organiske løsemidler vært testet, men ingen fundamental studier er gjort på organiske løsemidler i PALME. Funn i studiene for HF-LPME vil også til en viss grad gjelde PALME. Erfaringsmessig har det vist seg at diheksyleter, 1-oktanol og nitroaromatiske løsemidler har vært de mest brukte løsemidler i tre-fase ekstraksjonssystem [5,8,17]. Valget av riktig løsemiddel for ekstraksjonen er helt sentralt i PALME for å få optimal ekstraksjon og utbytte av en bestemt analytt eller en gruppe analytter.

## 4.5 Ekstraksjonstid

Det er vanlig at ekstraksjonen utføres til det har nådd likevekt. Etter at likevekten er oppnådd ser man liten eller ingen økning i utbytte [5,19]. Tiden det tar før en analytt oppnår likevekt kan variere fra analytt til analytt. Ekstraksjonstiden i PALME er betydelig redusert sammenlignet med HF-LPME, og man har klart å oppnå likevekt etter 15 minutter med ekstraksjon på grunn av redusert membrantykkelse (diskutert i kapittel 4.2) [15]. Figur 7 viser at ekstraksjonsutbyttene er høyest ved ekstraksjon på 15 minutter for petidin, haloperidol og metadon. For nortriptylin oppnås likevekten ved 30 minutter, men gir allikevel tilfredsstillende utbytter etter 15 minutter.



Figur 7. Ekstraksjonsutbytte versus tid for petidin, haloperidol, nortriptylin og metadon. Figuren er hentet fra [15].

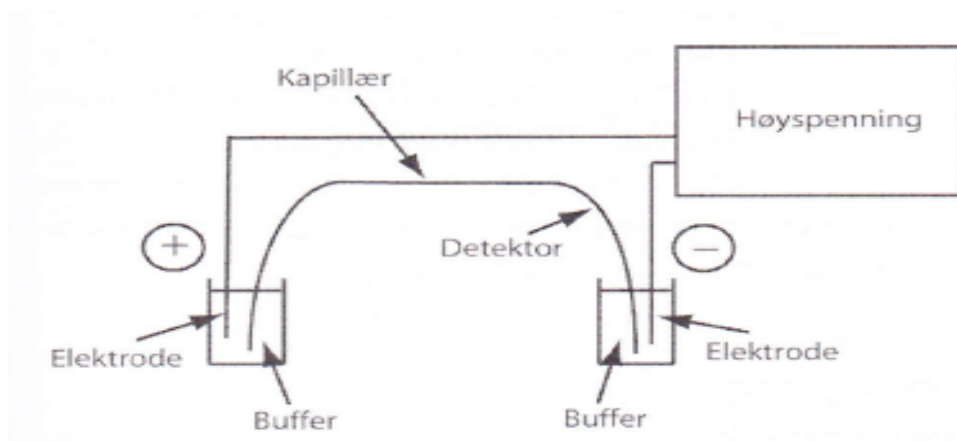
## 4.6 Kapillærelektroforese (CE)

CE er en viktig supplement innen legemiddelanalyse, og en offisiell teknikk omtalt i Ph.Eur. Analyse i CE er enkel, med svært effektiv separasjonsmetode [24]. Analysen foregår ved separasjon av analyttene basert på deres ladning og størrelse. Kapillæret i instrumentet er i størrelsesorden 30-70 cm langt med en indre diameter på 50-75  $\mu\text{m}$  der separasjonen foregår [25]. En liten mengde prøveløsning injiseres i kapillærets innløp. En måte å gjøre det på er å pålegge et lite overtrykk i prøveglasset slik at prøveløsningen injiseres i kapillæret. Deretter plasseres kapillærendene i hver sin vial med separasjonsbuffer. Separasjonsbufferen sikrer

konstant pH, og dermed ladning av analyttene gjennom hele analyseprosessen. Figur 8 viser prinsippskisse for CE.

De ioniserte molekylene migrerer i separasjonsbuffer når det pålegges en spenning på kapillæret slik at det dannes et elektrisk felt. Spenningen kan varieres, men er stort sett i området mellom 0-30 kV. I det elektriske feltet vil ionene migrere med ulik hastighet etter forholdet mellom molekylstørrelse og ladning.

Små ioner med flere ladninger vandrer raskere i det elektriske feltet, mens store ioner med få ladninger vil vandre med lav hastighet. Det betyr at stoffene i prøveløsningen, avhengig av deres egenskaper, ankommer kapillærets utløp til forskjellig tidspunkt. For deteksjon av analyttene sitter det normalt en UV-detektor, som sender UV-stråling på tvers av kapillæret [25]. Detektorsignalet plottes som funksjon av tid, og kalles et elektroferogram. I et elektroferogram vises en topp for hver av analyttene i prøveløsningen.



Figur 8. Prinsippskisse for CE. Figuren er hentet fra [25].

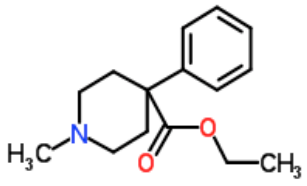
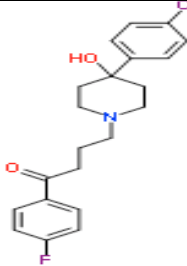
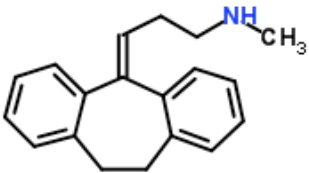
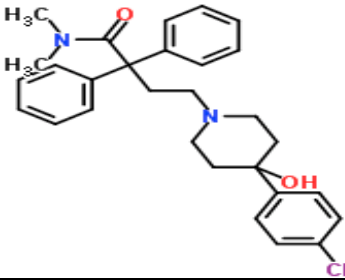
Migrasjonen av analyttene i det elektriske feltet går fra separasjonsbufferen med positive potensial til separasjonsbufferen med negative potensial. Deteksjonen finner sted i et lite vindu på kapillæret hvor en liten del av polyimidlaget er fjernet.

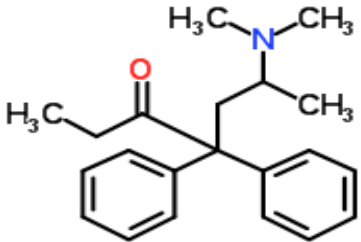
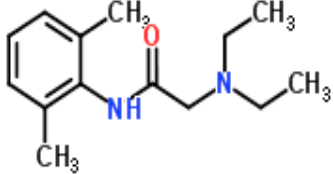
## 5 Eksperimentelt

### 5.1 Modellsustanser

Totalt ble det utvalgt 10 basiske legemidler som modellanalytter . Modellanalyttene har erfaringsmessig gitt gode resultater og utbytter i tidligere forsøk med HF-LPME og PALME [15,19]. De ble også valgt på grunnlag av migrasjonstid og UV-absorbans ved bruk av den valgte CE- metoden. Molekylene kjemiske struktur, fordelingskoeffisient, dissosiasjonskonstant, og produsenten er beskrevet i tabell 1.

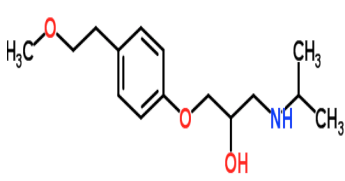
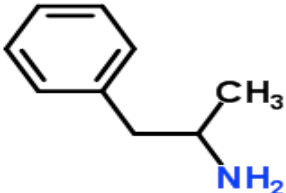
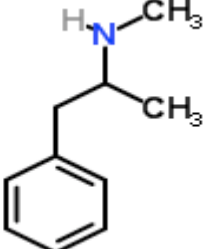
Tabell 1. Kjemisk struktur, fordelingskoeffisient ( $\log P$ ) og dissosiasjonskonstant ( $pK_a$ ) for upolare legemidler.

Struktur	Navn	Log P	Pka	Leverandør
	Petidin	2,46	8,16	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Haloperidol	3,66	8,05	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Nortriptylin	4,43	10,47	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA
	Loperamid	4,77	9,41	Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA

	<b>Metadon</b>	<b>5,01</b>	<b>9,12</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
	<b>Lidokain</b>	<b>2,84</b>	<b>7,75</b>	<b>Norsk medisinaldepot (NMD)</b>

Strukturene er hentet fra <http://www.chemspider.com/>. Dataene er hentet fra Scifinder

Tabell 2. Kjemisk struktur, fordelingskoeffisient (log P) og dissosiasjonskonstant (pKa) for polare legemidler.

<b>Struktur</b>	<b>Navn</b>	<b>Log P</b>	<b>Pka</b>	<b>Leverandør</b>
	<b>Metoprolol</b>	<b>1,76</b>	<b>9,67</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
	<b>Amfetamin</b>	<b>1,80</b>	<b>10,01</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
	<b>Metaamfetamin</b>	<b>2,24</b>	<b>10,21</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>

Strukturene er hentet fra <http://www.chemspider.com/>. Dataene er hentet fra Scifinder



## 5.2 Kjemikalier

Tabell 3: viser oversikt over kjemikaliene, kvaliteten og produsenten .

<b>Kjemikalier</b>	<b>Kvalitet</b>	<b>Leverandør</b>
<b>Diheksyleter</b>	<b>97 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>Triocetylamin</b>	<b>Ukjent</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>2-undekanon</b>	<b>99%</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>2-Nonanon</b>	<b>≥ 99%</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>Dodecylacetat</b>	<b>97 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>3-tolunitril</b>	<b>99 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>NPOE</b>	<b>≥ 99%</b>	<b>Fluka Chemie AG, Buchs, Sveits</b>
<b>Isopentylbensen</b>	<b>≥ 97 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>2,2-Dimetylpropylbensen</b>	<b>≥ 97 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>

<b>1-Oktanol</b>	<b>&gt; 99 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>1- Nonaol</b>	<b>98 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>1-Undekanol</b>	<b>99 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>Dodekan</b>	<b>≥ 99%</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>Heksadekan</b>	<b>99 %</b>	<b>Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA</b>
<b>Saltsyre</b>	<b>37 %</b>	<b>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</b>
<b>Natriumhydroksid</b>	<b>98 %</b>	<b>VWR, Chemi-Teknikk AS, Oslo, Norge</b>
<b>Natriumdihydrogenfosfat</b>	<b>Ukjent</b>	<b>Merk K GaA, Darmstadt, Tyskland</b>
<b>Orto-fosforsyre</b>	<b>85%</b>	<b>Ukjent</b>
<b>Destillert H<sub>2</sub>O</b>	<b>-</b>	<b>Millipore, MA, USA</b>

## 5.3 Instrument og betingelser

### 5.3.1 CE

Analyse av PALME ekstraktene ble utført med CE ( MDQ Beckman, Fullerton, CA, USA). Separasjonen foregikk på et fused-silika- kapillær med en indre diameter på 75  $\mu\text{m}$ , og en effektiv lengde på 50 cm (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA). Betingelsene ved CE instrumentet er oppført i tabell 4.

Tabell 4. Oversikt over parametere og betingelser ved CE.

<i><b>Parameter</b></i>	<i><b>Betingelse</b></i>
<i><b>Deteksjon</b></i>	<i><b>UV absorbans, 200 nm</b></i>
<i><b>Spenning</b></i>	<i><b>30.0 kV</b></i>
<i><b>Strøm</b></i>	<i><b>40-60 <math>\mu\text{A}</math></b></i>
<i><b>Injeksjon</b></i>	<i><b>0,5 psi, 5 sekunder</b></i>
<i><b>Prøvelagringsstemperatur</b></i>	<i><b>5 <math>^{\circ}\text{C}</math></b></i>

<i>Separasjonsbuffer</i>	<i>100 mM fosfatbuffer pH= 2,75</i>
<i>Separasjonstemperatur</i>	<i>25 °C</i>
<i>Analysetid</i>	<i>10 min</i>

Før hver analyseserie ble kapillæret kondisjonert med 10 mM natriumhydroksid (NaOH) i 5 minutter. Deretter ble systemet spylt med destillert vann i 2 minutter, og med separasjonsbuffer i 15 minutter. Mellom hver analyse innenfor samme serie ble kapillæret igjen spylt med separasjonsbuffer i 2 minutter. Den aktuelle separasjonsbuffer-vialen ble etter hver 6. analyse skiftet med en ny separasjonsbuffer-vial.

## 5.4 Tillaging av løsninger

### 5.4.1 Stamløsning av upolare legemidler

Stamløsningen ble laget ved å løse hver enkelt av renstoffene: petidin, nortriptylin, haloperidol, loperamid og metadon i etanol til en konsentrasjon på 1 mg/ml. Stamløsningene ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys.

### 5.4.2 Stamløsning av polare legemidler

Renstoff av petidin, metoprolol, amfetamin, metamfetamin og lidokain hver for seg ble løst i etanol til en konsentrasjon på 1 mg/ml. Stamløsningen ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys.

### 5.4.3 Standardløsning

500 µl av hver enkelt stamløsning av upolare legemidler på 1 mg/ml ble blandet sammen og fortynnet med destillert vann til en konsentrasjon på 50 µg/ml. Standardløsningen ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys. Samme prosedyre ble gjentatt for polare analytter.

### 5.4.4 Prøveløsning

Prøveløsningene fortynnet med NaOH ble laget hver uke.

Løsningene ble laget ved å fortynne standardløsningen 50 µg/ml med 10 mM NaOH til en konsentrasjon på 1 µg/ml. Prøveløsningen ble oppbevart ved 5 °C beskyttet mot lys.

### 5.4.5 Separasjonsbuffer (fosfatbuffer)

1,723 gram NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ble løst i vann til et volum på 500 ml. 421 µl orto-fosforsyre (85%) ble fortynnet med destillert vann til et volum på 250 ml. 25 mM orto fosforsyre ble titrert med NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> løsningen til en pH på 2,75.

### 5.4.6 Akseptorløsning

Løsningen ble laget ved å fortynne 829 µl konsentrert HCl (37%) med 100 ml destillert vann til en konsentrasjon på 100 mM. Videre ble løsningen fortynnet med destillert vann til en konsentrasjon på 10 mM. Akseptorløsningen ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys.

### 5.4.7 CE standardløsning

CE standarløsning ble laget ved å pipettere ut 2000 µl av standardløsningen på 50 µg/ml og fortynnet med 10 mM HCl til en konsentrasjon på 10 µg/ml.

Løsningen ble tillaget hver uke og ble oppbevart i romtemperatur beskyttet mot lys.

### 5.4.8 Natriumhydroksid løsning

Løsningen ble laget ved å veie ut 10,1056 gram NaOH fortynnet til en konsentrasjon på 1 M med 250 ml destillert vann. 1 M NaOH ble videre fortynnet til en konsentrasjon på 10 mM med destillert vann. Løsningen ble oppbevart ved romtemperatur og beskyttet mot lys.

## 6 Utstyr og prosedyre for PALME

### 6.1 Parallel Artificial Liquid Membrane Exctraction

PALME ble utført i en 96- brønns donorplate av polypropylen med 0,5 ml dybde på brønnene, fra Agilent (California, USA), og en hjemmelaget filterplate av vialer 0,2 ml med 8 strips fra Thermo scientific (UK) med flat porøs polypropylen membran- som akseptorplate. Oppsettet brukt i oppgaven er vist i *figur 6*. Membranen anvendt i oppgaven hadde en veggtykkelse på 100  $\mu\text{m}$  og en porestørrelse på 0,1  $\mu\text{m}$  ( Accurel PP 1E R / P , Membrana , Wuppertal , Tyskland ). Den flate membran ble mekanisk forseglet/smeltet på overflaten av vialene ved hjelp av cotech soldering iron station (Clas Ohlson AB, Insjon, Sverige) ( se figur 9,10 og 11) ved 145-175  $^{\circ}\text{C}$  for 5 sekunder. Den smale enden av vialen ble deretter avskåret. Hjemmelaget akseptorplate ble laget med 8 brønner av gangen ( se figur.12).

200  $\mu\text{l}$  prøveløsning bestående av petidin, nortriptylin, haloperidol, loperamid og metadon på 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ble overført til donorplaten. Deretter ble 50  $\mu\text{l}$  10 mM NaOH pipettert i hver brønn med prøveløsning. Dette for å gjøre prøven mer basisk og analyttene uladet for å få optimale ekstraksjonsbetingelser. På filterplaten med polypropylen flatmembran ble det pipettert inn 2,5  $\mu\text{l}$  organisk løsemiddel på hvert filter. Den kunstige væskemembranen ble immobilisert i polypropylen ved å vente noen sekunder før overskuddet av løsemiddelet ble fjernet med medisinsk tørkepapir. Over den kunstige væskemembranen ble 50  $\mu\text{l}$  10 mM HCl løsning fylt med pipette. Filterplaten ble derpå trykket sammen med donorplaten, og holdt på plass ved å teipe platene. Deretter ble lokket satt på og teipet sammen med donor- og filter-platen til en ”sandwich”. Hele oppsettet ble ristet på 900 rpm i 15 minutter på (Vibramax 100, Heidolph Instruments, Schwabach, Germany). Etter endt ekstraksjon ble prøveløsningen overført til

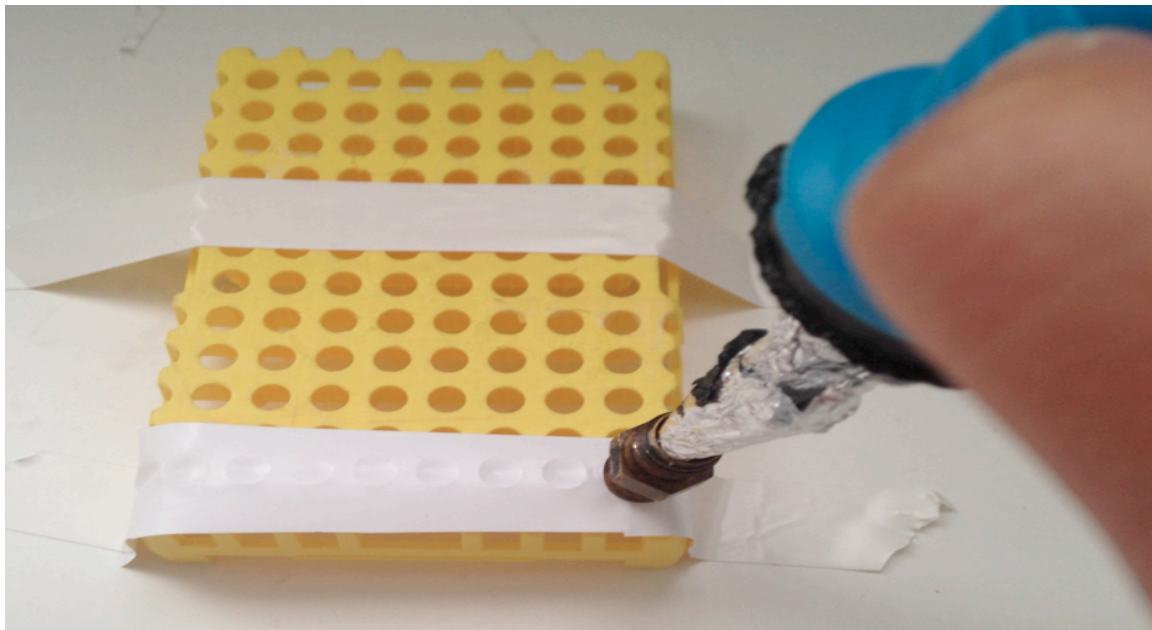
vialene (0,2 ml fra Thermo scientific, UK) og analysert med CE MDQ (Beckman, Fullerton, CA, USA) med UV som deteksjonsmetode.



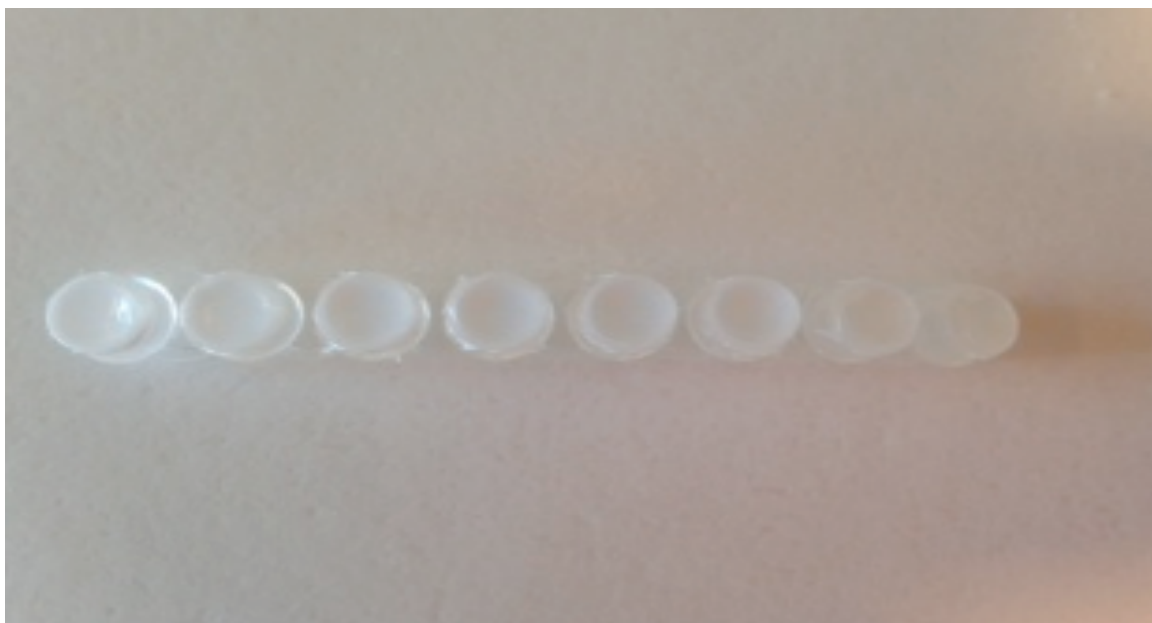
Figur.9 cotech soldering iron station apparatet.



Figur.10 et stykke polypropylen-membran og vialene



Figur.11 membranen mekanisk forsegles til vialene ved hjælp av cotech soldering iron station.



Figur 12. Ferdigstilt filterplate med 8 brønner i hver.



## 6.2 Veieforsøk av fordampning av væskemembranen

Et firkantet stykke polypropylen membran og et plastveieskip ble først veid på en analysevekt (Modell 200 AE, Mettler, Greifensee, Sveits) for å måle den nøyaktige vekten av membranen og veieskipet. Deretter ble membranen immobilisert med 10 µl organisk løsemiddel, og veid umiddelbart (tiden = 0). Videre forble membranen, fuktet med løsemiddelet, på analysevekten. Vekten på væskemembranen ble deretter målt nøyaktig 3 timer etter immobilisering.

## 6.3 Stabilitet av væskemembranen

200 µl prøveløsning av petidin, nortriptylin, haloperidol, loperamid og metadon på 1 µg/ml ble overført til donorplaten. Forsøkene ble utført med 4-8 paralleller for hvert løsemiddel. 50 µl 10 mM NaOH ble pipettert i hver brønn med prøveløsning. Membranen ble fuktet med 2,5 µl diheksyleter og anvendt ved tiden 0. Nye membraner ble fuktet med 2,5 µl diheksyleter og ble lagt av i 1 time ved romtemperatur før de ble benyttet i ekstraksjonen. Platene ble satt sammen og agitert ved 900 rpm i 15 minutter, deretter ble akseptorløsningen analysert ved CE. Utbyttene ble beregnet for ekstraksjon både ved t=0, t=1 og t=3 timer og sammenlignet. Tilsvarende prosedyre ble utført med dodecylacetat og isopentylbensen.

## 6.4 Påsetting av kunstig væskemembran

I dette eksperimentet ble ekstraksjonen utført med 8 paralleller i hvert forsøk. 200 µl prøveløsning av petidin, nortriptylin, haloperidol, loperamid og metadon på 1 µg/ml ble overført til donorplaten. 50 µl NaOH ble ytterligere tilsatt i donorplaten. Polypropylen membranen ble påsatt 2,5 µl diheksyleter fra undersiden av filterplaten, og overskuddet ble tørket med medisinsk tørkepapir. 50 µl 10 mM HCl akseptorløsning ble fylt i brønnene på filterplaten. Platene ble satt sammen og agitert ved 900 rpm i 15 minutter, deretter ble akseptorløsningen analysert ved CE. Tilsvarende ble gjentatt, men polypropylen membranen ble nå påsatt væskemembranen fra oversiden av filterplaten uten å bli tørket med medisinsk tørkepapir. Ekstraksjonsutbyttene ble beregnet og sammenlignet.

## 6.5 Beregning av utbytte

Utbytte av ekstraktene ble bestemt ut fra følgende formel (16):

$$R = \frac{n_{a, \text{final}}}{n_{s, \text{initial}}} \times 100\% = \frac{V_a \times C_{a, \text{final}}}{V_s \times C_{s, \text{initial}}} \times 100\% \quad (5)$$

$n_s$  var antall mol av analytten i prøveløsningen (donor) før ekstraksjonen, og  $n_a$  var antall mol av analytten i akseptorløsningen etter ekstraksjon.  $C_a$  var legemiddelets konsentrasjon i akseptorfase etter ekstraksjon, og  $V_a$  var volumet av akseptorfase.  $C_s$  var legemiddelkonsentrasjon i prøveløsningen før ekstraksjon, og  $V_s$  var volumet av prøveløsningen.

## 6.6 Q-Test

For å forkaste enkelte målinger som avvok betydelig fra resten av resultatene i analysen, ble det utført Q-tester. Q-verdien ble beregnet etter følgende formel:

$$Q = \frac{X_i - X_{\text{krit}}}{X_1 - X_{\text{krit}}} \quad (6)$$

$X_{\text{krit}}$  var den avvikende verdien som skulle forkastes, og  $X_i$  var verdien i måleserien nærmest  $X_{\text{krit}}$ . Dersom  $X_{\text{krit}}$  tilsvarte den største verdien i måleserien, så var  $X_i$  den minste verdien. Hvis  $X_{\text{krit}}$  derimot var minste i måleserien, så var  $X_i$  den største verdien i analyseserien. Ved beregning ble det tatt utgangspunkt i tabellverdi for Q ved 96 % konfidensnivå. Dersom den beregnede verdien for Q var større enn tabellverdien, ble avvikende verdien forkastet og ikke tatt med i videre beregning av T-test. Avvikende verdi ble ikke forkastet dersom beregnet Q-verdi var lavere enn tabellverdi [25].

## 6.7 T-test

For å kunne trekke slutninger om to sett målinger var signifikant forskjellige, ble det utført T-tester med 95 % konfidensnivå ved sammenligning av forsøk. T-testene ble utført ved å sammenligne gjennomsnittet for begge måleseriene, hvor den ene måleserien ble benevnt  $X_1$  og den andre måleserien benevnt  $X_2$ . Først ble det beregnet felles standardavvik for de to måleseriene, hvor  $s_1$  var standardavviket til målingene i serie 1 og  $s_2$  var standardavviket til målingene i serie 2. Antall målinger i serie 1 ble benevnt  $n_1$ , mens antall målinger i serie 2 ble benevnt  $n_2$  med følgende formel:

$$S_{\text{felles}} = \frac{\sqrt{s_1^2(n_1-1) + s_2^2(n_2-1)}}{n_1 + n_2 - 2} \quad (7)$$

T-verdien ble beregnet fra følgende formel:

$$T = \frac{X_1 - X_2}{S_{\text{felles}}} \times \frac{\sqrt{n_1 \times n_2}}{n_1 + n_2} \quad (8)$$

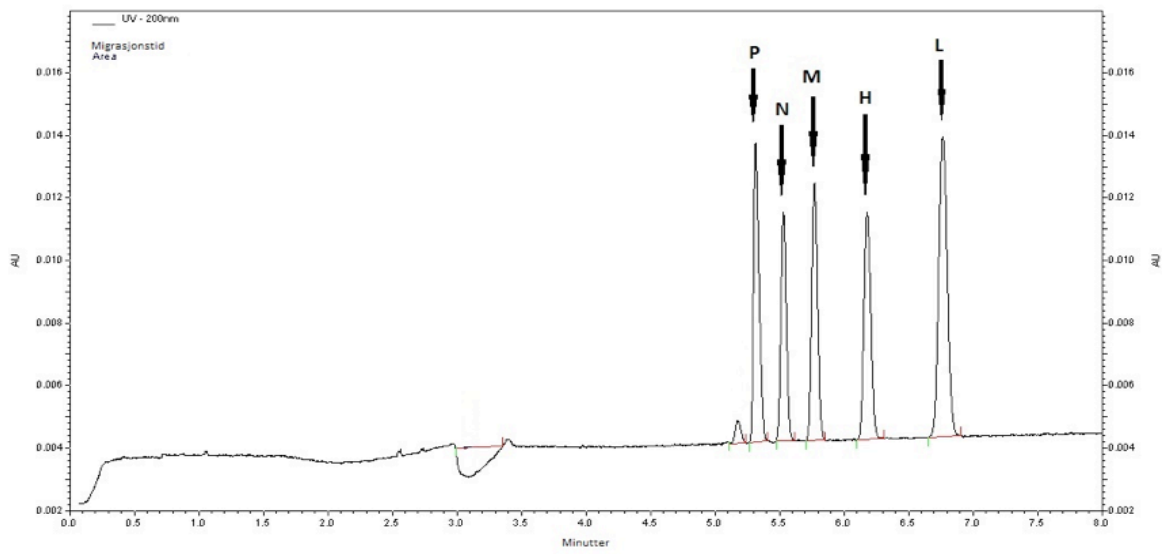
Beregnet verdi ble sammenlignet med T-verdi fra tabell. En beregnet T-verdi høyere enn tabellverdi, ga 95 % sannsynlighet for at den sanne verdi for de to måleseriene er forskjellig. Resultatet ble ikke signifikant forskjellig dersom beregnet T-verdi var mindre enn eller lik tabellverdi [25, 26]

## 7. Resultater og diskusjon

Etter at PALME ble introdusert i 2013 er det kun blitt publisert en artikkel om teknikken hvor variasjonen i ekstraksjonstid, agitasjon, organisk fase, mengde prøveløsning og akseptorløsning har blitt undersøkt [15]. Forsøkene var basert på basiske modellanalytter med log  $P$  fra 2,46 til 5,01 [15]. I dette arbeidet ble det undersøkt 10 basiske legemidler som modellanalytter og dette inkluderte både polare og upolare legemidler. Det var ønskelig å screene løsemidler med ulike fysikalske og kjemiske egenskaper og selektere frem de beste løsemidlene som kan anvendes i videre arbeid med PALME. Det ble også undersøkt stabiliteten til væskemembranen som funksjon av tid og hvordan ulik måte å påsette det organiske løsemiddelet, innvirket på ekstraksjonsutbyttene.

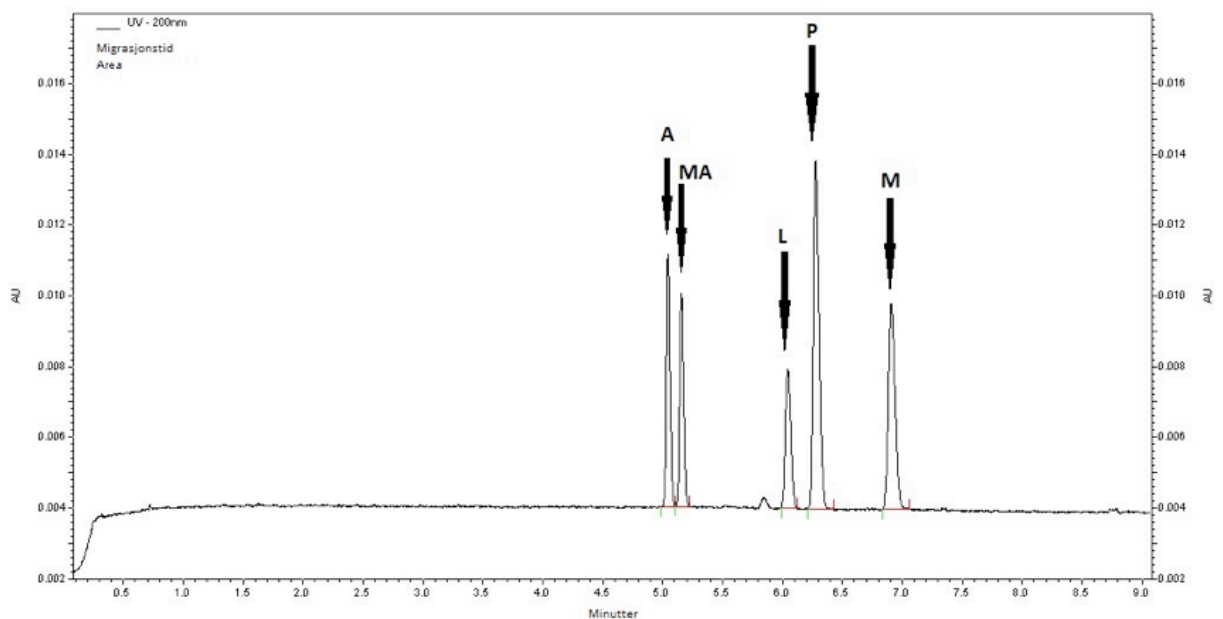
### 7.1 Innledende forsøk

PALME ble utført med vandige prøveløsninger av basiske legemiddelanalytter nevnt tidligere i oppgaven. Innledningsvis ble det utvalgt fem basiske analytter basert på deres upolare egenskaper. Deretter ble deres migrasjonstid i kapillærelektroforese bestemt (se figur 13). Det ble utført eksperimentelle forsøk for å stadfeste rekkefølgen av analyttene i elektroferogrammet. Løsningene med enkelt stoffene ble laget ved å fortynne hver av de 5 stamløsningene på  $1 \text{ mg/ml}$  med 10 mM HCl til en konsentrasjon på  $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . De fem løsningene ble analysert hver for seg i CE, og rekkefølgen ble bestemt ved å se på migrasjonstiden for hver enkelt av stoffene. CE standardløsningen ble brukt som referanseløsningen og ble tillaget ved å fortynne standardløsningen med 10 mM HCl til en konsentrasjon på  $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ . Etter å ha screenet alle løsemidlene med de fem analyttene ble fem nye analytter valgt basert på deres polare karakter og analysert ( se figur 14). Elektroferogram viser en fin separasjon av utvalgte stoffer ( figur 13 og 14)



Figur. 13 Migrasjonsrekkefølge i CE for de upolare analyttene

*P = petidin, N = nortriptylin, M = metadon, H = haloperidol og L = loperamid*



Figur. 14 Migrasjonsrekkefølge i CE for de polare analyttene

*A = amfetamin, MA = metamfetamin, L = lidokain, P = petidin, M = metoprolol*

## 7.2 Ekstraksjon med PALME

Det er viktig at løsningene er kompatible med analyseinstrumentet og er optimale for å kunne gi god ekstraksjonsutbytte. De upolare analyttene, akseptor og NaOH løsningen og metoden benyttet i analyseinstrumentet ble stort sett valgt ut fra erfaringer gjort i tidligere studier [8,15, 20]. Initielt ble 15 løsemidler tilhørende ulike løsemiddel grupper utvalgt som kandidater. Både løsemidler som er ofte brukt i HF-LPME og mindre brukte løsemidler ble valgt for dette formålet.

### 7.2.1 Ekstraksjon med ulike væskemembraner

I eksperimentet ble det fokusert på ekstraksjonsutbytte av analyttene ved bruk av organiske løsemidler fra ulike løsemiddelgrupper. Det er mange faktorer som må tas hensyn til for å oppnå tilfredsstillende utbytter. For eksempel har riktig valg av organisk fase en stor betydning for graden av ekstraksjonsutbytte. Det organiske løsemiddelet bør ha lav vannløselighet slik at den ikke lekkes i akseptor-donorløsningen som nevnt tidligere i oppgaven (se kapittel 4.4).

Videre bør ikke løsemidlet være for flyktig, og gi høye verdier for  $K_{org/don}$  og  $K_{aks/org}$  for å sikre god utbytte [5,22]. De mye brukte løsemidlene har vært diheksyleter og 1-oktanol som begge oppfyller kriteriene nevnt ovenfor. I tillegg til diheksyleter og 1-oktanol, har også løsemidlene NPOE og 1-nonanol vært anvendt i eksperimenter med HF-LPME og oppfyller kravene [17]. Løsemidlenes egenskap og løselighet er oppsummert i tabell 5.

Tabell.5 oversikt over løseligheten og kjemiske egenskaper av løsemidlene.

Løsemiddel	Vannløselighet ug/mL pH 10	H-donor	H-akseptor	Log <i>P</i>	Løsemiddel Gruppe <sup>1</sup>
Diheksyleter	110	0	1	5,12	1
Triocetylamin	0,2	0	1	10,82	1
2-Nonanon	1100	0	1	3,02	2
Dodecylacetat	20	0	2	5,88	2
3-Tolunitril	640	0	1	2,12	2
NPOE	6	0	4	5,35	2
2-Undekanon	240	0	1	4,03	2
Ispopentylbensen	3	0	0	4,60	4
2,2Dimetylpropylbensen	2	0	0	4,85	4
1-oktanol	1200	1	1	2,88	5
1-Nonanol	390	1	1	3,39	5
1-Undecanol	34	1	1	4,41	5
Dodekan	<1	0	0	6,82	6
Heksadekan	<1	0	0	8,86	6

Dataene er hentet fra scifinder

<sup>1</sup>Løsemiddel rangeringen er hentet fra [27].

### 7.2.2 Ekstraksjon av upolare analytter

I dette arbeidet ble løsemidler med ulike egenskaper og funksjonelle grupper testet som væskemembran for ekstraksjon av utvalgte upolare analytter. Valget av løsemidlene var basert på tidligere og tilsvarende erfaring fra HF-LPME [20,21]. Noen nye og mindre brukte organiske løsemidler ble også testet i eksperimentet og disse er inkludert i tabell 6. Disse løsemidlene vil kanskje være interessante kandidater for fremtidige eksperimenter med PALME. Hensikten med å screene mange løsemidler var å karakterisere selektiv ekstraksjon av analytter basert på deres

polaritet. Innledningsvis ble fenetol og dibensylamin inkludert i eksperimentene, men det viste seg at ingen av løsemidlene var brukbare som løsemidler for PALME. Ekstraksjoner med dibensylamin ga en stor topp i elektroferogrammet, og dette kan skyldes at dibensylamin delvis lakk ut i donor-akseptorfasen og dermed påvirket ekstraksjonsprosessen. Fenetol derimot ga veldig lave utbytter og ble også ekskludert fra resten av forsøkene.

Alle fem analyttene i dette forsøket var relativt upolare. Tabell 1 viser deres struktur, pka- og log P-verdier, og de tilhørende resultatene er oppsummert i tabell 6. Løsemidlene i sistnevnte tabell er rangert etter økende løsemiddelgruppe.

Løsemidlene med god ekstraksjonsytbytte var diheksyleter, dodecylacetat, isopentylbensen og 2,2-dimetylpropylbensen. Alle løsemidlene ga et gjennomsnittelig utbytte på over 80 % og lave RSD verdier. Løsemidlene hadde lav vannløselighet (se tabell 5) og væskemembran laget av disse var derfor stabile under ekstraksjonen. Både før og etter ekstraksjonen er det lite ønskelig at løsemidlet fordamper. En viktig egenskap hos løsemidlene er derfor deres høye kokepunkt da væskemembranen er eksponert for luft i ca.1 minutt før den settes sammen med donorplaten. Generelt bør ikke løsemidler med kokepunkt under 190 °C anvendes (se tabell 10).

Et viktig moment som kan ses fra tabell 5 er at disse fire løsemidlene har en log  $P$  verdi mellom 3-5. Det betyr at fordelingsforholdet mellom prøveløsningen og væskemembranen  $K_{org/don}$  var høy nok til å promotere diffusjon fra donorløsningen til den organiske væskemembranen. De basiske upolare analyttene løste seg best i forholdsvis upolare løsemidlene med litt dipol egenskaper, og det indikerte de høye resultatene på ekstraksjonsutbytte for disse analyttene. Upolare analytter er lettere ekstrahert av upolare løsemidler fordi de generelt har høy fordelingskoeffisient og lett kan danne interaksjoner med løsemiddelet. Diheksyleter er mye brukt i eksperimentell arbeid med HF-LPME. Isopentylbensen, dodecylacetat og 2,2 dimetylpropylbensen er ikke mye brukte løsemidler for dette formålet, og kan anses som alternative organiske væskemembraner for upolare basiske legemidler i PALME.



Tabell 6. Rangering av væskemembraner for basiske modellanalyttene

Løsemiddel	Utbytte (%) (n =8)							Gjennomsnittsutbytte <sup>1</sup>
	Løsemiddel gruppe <sup>2</sup>	Petidin	Lidokain	Haloperidol	Nortriptylin	Loperamid	Metadon	
<b>Diheksyleter</b>	1	94	97	100	65	94	89	<b>90</b>
<b>Trioctylamin</b>	1	44	60	18	28	9	82	<b>40</b>
<b>2-Nonanon</b>	2	82	98	89	76	75	77	<b>83</b>
<b>Dodecylacetat</b>	2	94	85	93	81	86	73	<b>85</b>
<b>3-Tolunitril</b>	2	86	68	-	-	14	68	<b>42</b>
<b>NPOE</b>	2	62	65	71	59	48	63	<b>61</b>
<b>2-Undekanon</b>	2	91	54	88	70	77	74	<b>83</b>
<b>Isopentylbensen</b>	4	91	93	100	82	74	92	<b>89</b>
<b>2,2-Dimetylpropylbensen</b>	4	73	94	100	88	71	89	<b>86</b>
<b>1-Oktan</b>	5	75	73	56	61	22	70	<b>60</b>
<b>1-Nonanol</b>	5	77	82	51	54	27	57	<b>58</b>
<b>1-Undekanon</b>	5	72	77	49	51	32	58	<b>57</b>
<b>Dodekan</b>	6	61	63	77	72	46	81	<b>67</b>
<b>Heksadekan</b>	6	44	64	85	95	25	92	<b>67</b>

<sup>1</sup> Gjennomsnittelig utbytte av petidin, nortriptylin, metadon, haloperidol, loperamid og lidokain

<sup>2</sup> Gruppe rangeringen av løsemidlene er hentet fra [27]

### 7.2.3 Ekstraksjon av polare analytter

I neste forsøksserie ble de samme løsemidlene testet som organisk væskemembran med ny gruppe av analytter. De basiske polare analyttene amfetamin, metamfetamin og metoprolol ble utvalgt. Petidin ble gjenvalgt for å undersøke reproduserbarheten til teknikken. Struktur, pK<sub>a</sub>- og log<sub>10</sub>*P* verdiene er vist tabell 2 og resultatene er oppsummert i tabell 7. Løsemidlene er rangert i henhold til økende løsmiddelgruppe.

De fire mest effektive løsemidlene for ekstraksjon av de polare analyttene var 2-nonanon, 3-tolunitril, 1-oktanol og 1-nonanol med et gjennomsnittelig utbytte på over 67 % og lave RSD verdier. Både 1-oktanol og 3-tolunitril har en log *P*-verdi på henholdsvis 2,88 og 2,12, mens 2-nonanon og 1-nonanol har log *P* på 3,02 og 3,39. Disse løsemidlene er mer polare enn løsemidlene nevnt i tidligere avsnitt, og gir høy fordelingskoeffisient for de polare analyttene til å diffundere over til væskemembranen. Det er tidligere ikke blitt benyttet 3-tolunitril i eksperimenter med mikroekstraksjon og kan brukes som en alternativ organisk væskemembran for polare basiske legemidler i PALME. Et interessant funn var at trioctylamin tilhørende gruppe 1 ga dårlig ekstraksjonsutbytte både for de polare og upolare analyttene. Ut ifra tabell 5 ser man at dette løsemidlet har en log *P*- verdi lik 10 – noe som muligens kan medføre til at fordelingskoeffisienten  $K_{a/d}$ , blir for lav til å kunne få høyt utbytte for ekstraksjonen.

Fordelingskoeffisientens størrelse avhenger av analyttens lipofile egenskaper og av løsemidlets egenskaper. Da ioniseringen av analyttene er undertrykt i prøveløsningen vil tiltrekningskreftene som kan virke mellom løsemidlene og analyttene være dispersjonskrefter, dipolinteraksjoner og hydrogenbindinger. Disse interaksjonene er av varierende styrke der hydrogenbindinger gir de sterkeste interaksjonene og betyr mest for løseligheten av stoffer som bidrar til disse interaksjonene.

Tabell 7. PALME ekstraksjon med ulike organiske løsemidler som væskemembran for polare modellanalytter.

Løsemiddel	Utbytte ( %) (n=8)			Gjennomsnittsutbytte <sup>1</sup>	
	Løsemiddel- gruppe	Metoprolol	Amfetamin		Metamfetamin
<b>Diheksyleter</b>	1	26	71	93	<b>63</b>
<b>Trioctylamin</b>	1	-	6	12	<b>6</b>
<b>2-Nonanon</b>	2	88	92	96	<b>92</b>
<b>Dodecylacetat</b>	2	38	69	87	<b>65</b>
<b>3-Tolunitril</b>	2	61	72	76	<b>70</b>
<b>NPOE</b>	2	12	32	49	<b>31</b>
<b>2-Undekanon</b>	2	56	62	68	<b>62</b>
<b>Isopentylbensen</b>	4	32	73	88	<b>64</b>
<b>2,2 Dimetylpropylbens- en</b>	4	24	68	86	<b>59</b>
<b>1-Oktanol</b>	5	62	67	77	<b>68</b>
<b>1-Nonanol</b>	5	60	80	82	<b>74</b>
<b>1-Undekanol</b>	5	36	55	72	<b>54</b>
<b>Dodekan</b>	6	-	42	63	<b>35</b>
<b>Heksadekan</b>	6	-	29	57	<b>29</b>

<sup>1</sup> Gjennomsnittelig utbytte av metoprolol, amfetamin og metamfetamin

Resultatene i tabell 6 og 7 indikerer mange viktige momenter. Resultatene viser at ekstraksjonsutbyttene er påvirket av type løsemiddel brukt som væskemembran. Løseligheten i det organiske løsemidlet er avhengig av tiltrekningskreftene som virker mellom analytten og løsemiddelet. Generelt fungerte alle løsemidlene utvalgt i oppgaven som væskemembran i PALME, men noen løsemidler ga bedre utbytte enn andre. De beste løsemidlene for upolare analytter tilhørte ulike løsemiddel grupper ifølge Kamlet og Taft klassifisering [27]. Både isopentylbensen og 2,2 dimetylpropylbensen tilhørte gruppe IV A (aromatisk etere, hydrokarboner og halogenerte forbindelser). Dodecylacetat tilhørte gruppe II (estere og ketoner), og diheksyleter derimot tilhørte gruppe I (alifatiske etere og aminer). Selv om det var store strukturelle forskjeller mellom de ulike gruppene av løsemidlene, var de relative like i selektivitet, log  $P$  og dipolegenskaper. Disse løsemiddelegenskapene kan forklares ved hjelp av Kamlet og Taft parametere. Disse parameterne beskriver et løsemiddelets evne til å fungere som hydrogen donor, hydrogenakseptor eller evne til å danne dipol-interaksjon. Gruppe I, II og IV A er karakterisert ved høy dipolmoment. Gruppe I og II har også høye protonakseptoregenskaper og lave protondonoregenskaper, mens gruppe IV A har lave protondonor- og akseptoregenskaper. Det indikerer at det oppstod en sterk dipol-dipol interaksjon mellom løsemidlene og de uladete basiske analyttene og dette førte videre til stor fordelingskoeffisient og dermed høyt utbytte. Gruppe V (alkoholer) og VI (alifatiske hydrokarboner) viste seg å være mindre effektive løsemidler for ekstraksjon av basiske upolare analytter. Det kan skyldes alkoholenes høye hydrogen donor egenskaper, og de basiske analyttenes protonakseptor egenskaper ga sterke hydrogenbindingsinteraksjoner. Hydrogenbindingsinteraksjonene kan ha ført til at analyttene ble fanget i væskemembranen og mengde analytt som diffunderte over til akseptorfasen ble dermed begrenset. De lave utbyttene av upolare analytter med gruppe V (alkoholer) kan forklares med dette fenomenet. Løsemidler tilhørende gruppe VI (alifatiske hydrokarboner) derimot var veldig upolare og bidro til svake løsemiddel-analytt interaksjoner. Gruppe VI er derfor ikke første valget til ekstraksjon i PALME.

De mest effektive løsemidlene for polare analytter tilhørte, ifølge Kamlet og Taft klassifisering, gruppe II og V. Generelt vet man fra tidligere eksperimenter og funn at ketoner er egnet som gode kandidater for ekstraksjon av basiske stoffer [15,17,28]. Dette bekreftes også av forsøk utført i dette arbeidet hvor gruppe II viste høye utbytter med både polare og upolare analytter. Løsemidlene 2-nonanon, 3-tolunitril, 1-nonanol og 1-oktanol ga høyt utbytte og er rangert i tabell 7 etter økende løsemiddelgruppe. Gruppe II og V er veldig forskjellige når det gjelder selektivitet, dipolmoment, hydrogen donor- og hydrogenakseptoregenskaper. Som nevnt over

danner 2-nonanon og 3-tolunitril sterke dipol-dipol interaksjoner og gir dermed høye utbytter. Høyt utbytte ved bruk av alkoholer (V) kan forklares av deres hydrogendonor egenskapene og de basiske analyttenes evne til å akseptere hydrogenbindinger.

Ekstraksjonsutbyttene av polare analytter ble høyere ved bruk av løsemidler som hadde mer polar karakter enn det som ble observert for upolare analytter. For upolare analytter var ekstraksjonsutbyttet høyere med løsemidler med mer upolar karakter. Selv om upolare løsemidler også ga et høyt utbytte av polare analytter, var dette allikevel ikke høyere enn utbyttet for upolare analytter med de samme løsemidlene, og omvendt. Grunnen til dette er at fordelingskoeffisienten og dermed løseligheten til modellanalyttene blir større for den organiske væskemembranen når egenskapene er relativt like. Et velkjent prinsipp innen kjemien er læren om at «likt løser likt». Heksadekan og dodekan rangert nederst i tabell 7 for polare analyttene og 1-nonanol, 1-undekanol og 1-oktanol rangert blant de nederste løsemidlene i tabell 6 for de upolare analyttene, ga dårligst utbytte. Dermed ble gruppe VI (alifatiske hydrokarboner) for polare basiske analytter og gruppe V (alkoholer) for basiske upolare analytter funnet å gi lav utbytte. Cluster I, II og IV av Kamlet og Taft løsemidler egnet seg for både polare og upolare analytter og bør vurderes for fremtidig implementering i PALME.

Tidligere erfaringer med HF-LPME har vist at ekstraksjonsutbyttet i tre-fase system er høyest for analytter med  $\log P$  mellom 2-4 [29]. Dette mønsteret ble også bekreftet i PALME. Utbyttene av de fire beste løsemidlene for upolare og polare analyttene er oppsummert i tabell 8. Analyttene er rangert etter økende  $\log P$  verdi. Fra tabellen ser man at utbyttene for analyttene øker med økende  $\log P$  verdi frem til  $\log P$  3,66. Fra  $\log P$  3,66 begynner ekstraksjonsutbyttene å minke. For slike legemidler vil ekstraksjonen fra væskemembraner inn til den vandige akseptorfasen være begrenset. Ekstraksjon i slike tilfeller er utfordrende og krever løsemidler som gir bedre selektivitet for analyttene. Dette gjør valg av løsemiddel til relativt polare basiske analytter ( $\log P$  under 1,5) og upolare analytter ( $\log P$  over 4) kritisk.

Tabell 8. Økning av utbyttet for analyttene med økende log P-verdi.

Analytt	log. P <sup>1</sup>	Gjennomsnittsutbytte <sup>2</sup>
Metoprolol	1,76	68
Amfetamin	1,80	78
Metamfetamin	2,24	83
Petidin	2,46	88
Lidokain	2,84	92
Haloperidol	3,66	98
Nortriptylin	4,43	79
Loperamid	4,77	81
Metadon	5,01	85

<sup>1</sup> Dataene er hentet fra Scifinder

<sup>2</sup> Gjennomsnittelig utbytte for hver analytt med de fire effektive løsemidlene

Allikevel er valg av løsemiddel mindre kritisk for PALME sammenlignet med HF-LPME. De analytiske dataene i dette forsøket var forskjellig fra dataene med tilsvarende forsøk i HF-LPME rapportert i tidligere arbeid [17]. Denne observasjonen kan forklares teoretisk av følgende ligning for beregning av utbytte ved likevekt i tre-fase system [22] :

$$R = [100 \times K_{a/d} \times V_a] / [K_{a/d} \times V_a + K_{org/d} \times V_{org} + V_d] \quad (9)$$

hvor  $K_{a/d}$  er fordelingskoeffisienten for analytten mellom akseptorløsning og prøveløsningen (donor),  $K_{org/d}$  er fordelingskoeffisienten for analytten mellom væskemembranen (organisk fase) og prøveløsningen,  $V_a$  er volumet av akseptorløsning,  $V_{org}$  er volumet av væskemembranen (organisk fase), og  $V_d$  er volumet av prøven (donor). En stor reduksjon i volum av væskemembranen ( $V_{org}$ ) fra 15  $\mu$ l i HF-LPME til 2,5  $\mu$ l og volum av prøveløsningen fra 500  $\mu$ l i HF-LPME til 200  $\mu$ l i PALME resulterer i en økning av utbytte med ca. 20 % ved  $K_{a/d} = 200$  og en økning av utbytte på ca. 5,3 % ved  $K_{a/d} = 1000$  (se tabell 9). Fordelingskoeffisienten for et gitt løsemiddel vil være den samme i PALME og HF-LPME. Både de eksperimentelle dataene og de teoretiske beregningene understøtter at stor variasjon i volumet av væskemembranen, akseptor

og prøveløsningen spiller en betydelig rolle for ekstraksjonsutbyttene. Lavere volum av  $V_{org}$  har ført til bedre utbytte ved bruk av de samme løsemidlene i eksperimentet. Det betyr at mengden løsemiddel brukt som væskemembran er viktig for ekstraksjonsutbytte av de analytiske dataene. I tillegg til lavere bruk av løsemiddel er også volumet av prøveløsningen redusert kraftig fra 500  $\mu\text{l}$  - 1 ml i HF-LPME til 250-450  $\mu\text{l}$  i PALME som også kan være en årsak til bedre resultater i PALME. Dessuten hadde forskjellen i fordelingskoeffisienten ( $K_{a/d}$ ) i PALME ikke stor effekt på utbyttene, men derimot hadde en forskjell i fordelingskoeffisienten ( $K_{a/d}$ ) i HF-LPME stor effekt på utbytte ( se tabell 9).

Tabell 9. Teoretisk utbytte i HF-LPME og PALME med forskjellige  $K_{a/d}$  verdier

	Utbytte (%)	
	PALME <sup>1</sup>	HF-LPME <sup>2</sup>
$K_{a/d} = 1000$	99	93,75
$K_{a/d} = 200$	95,23	75

<sup>1</sup>  $K_{org/d} = 100$ ,  $V_a = 50 \mu\text{L}$ ,  $V_d = 200 \mu\text{L}$ ,  $V_{org} = 2,5 \mu\text{l}$

<sup>2</sup>  $K_{org/d} = 100$ ,  $V_a = 30 \mu\text{L}$ ,  $V_d = 500 \mu\text{L}$ ,  $V_{org} = 15 \mu\text{l}$

Et annet viktig faktum som kan ha bidratt til bedre analyseresultater, er bruk av tynn membran. Bedre utbytter av analyttene i PALME kan også være en direkte konsekvens av reduksjon i membrantykkelsen fra 200  $\mu\text{m}$  i HF-LPME til 100  $\mu\text{m}$  i PALME systemet. Med tynnere membran vil diffusjonsveien fra væskemembranen og til akseptorløsningen av analyttene være kortere, noe som gjør at motstanden mot diffusjonen til akseptorløsningen vil være mindre. På grunn av reduksjon i volum og tykkelsen på den organiske væskemembranen gir dette redusert ekstraksjonstid (se ovenfor) og utvidet ekstraksjonsutbytter. Redusert tykkelse motvirker også ulempen med liten kontaktoverflate av membranen i PALME.

### 7.3 Veieforsøk med væskemembranen

I det neste eksperiment ble flyktigheten av de løsemidlene som gav best resultat testet med hensyn til fordampning fra polypropylen membranen. Fordampning av løsemiddelet fra membranen kan være et problem og påvirke sluttresultatet. Informasjon om stabiliteten er derfor nødvendig ved valg av løsemiddel til PALME eksperimenter. Forsøket ble utført ved å impregnere membranen med diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbensen. Fordampning ble målt som funksjon av tid for hvert løsemiddel på analysevekt. Vekttapet ble målt ved tidspunktet 0 og 3 timer. Resultatene er oppført i tabell 10. Løsemidlene er rangert etter minst fordampning fra membranen. Dodecylacetat ble funnet å være mest stabil også 3 timer etter impregnering. Tap av løsemiddelet var ikke målbart selv etter 3 timer med eksponering i luft ved romtemperatur. Fordampning av diheksyleter og isopentylbensen var merkbart etter 3 timer. Tapet av løsemiddelet var stort for isopentylbensen i motsetning til diheksyleter. Tilnærmet var all isopentylbensen fordampet bort.

Med dette kan man si at løsemidlene med kokepunkt rundt 200°C er stabile i romtemperatur i en viss tid før ekstraksjonen utføres. Tap av væskemembranen er lavest når den tas i bruk under 1 time etter påsetting av løsemidlet. Det er viktig å opprettholde integriteten til væskemembranen under håndtering for å påvirke ekstraksjonsutbyttene minst mulig. I praksis bør man bruke væskemembranen kort tid etter impregnering for å sikre at fordampning av løsemiddelet er minimalt. Dette vil også sikre at resultatene blir pålitelig og nøyaktige. Utifra tabell 10 er anbefalingen at man ikke bruker løsemidler med kokepunkt under 200-220 °C da det kan øke sjansen for fordampning og føre til ustabil væskemembran.



Tabell 10. Fordampning av diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbensen ved tiden 0 og 3 timer.

	Kokepunkt <sup>1</sup> (°C)	Vekt av væskemembranen	
		Ved immobilisering <sup>2</sup>	Etter 3 timers lagring <sup>3</sup>
<b>Dodecylacetat</b>	265 °C	0,0102 g	0,0102 g
<b>Diheksyleter</b>	223 °C	0,0086 g	0,0064 g
<b>Isopentylbensen</b>	193 °C	0,0088 g	0,0034 g

<sup>1</sup>Dataene er hentet fra Scifinder

<sup>2</sup>Vekt av væskemembranen rett etter immobilisering ( 0.timer)

<sup>3</sup>Vekt av væskemembranen 3 timer etter immobilisering

## 7.4 Stabilitet av væskemembranen

Etter å ha utført et enkel vektforsøk, ble det i det neste eksperimentet vektlagt å kartlegge ekstraksjonsutbyttene etter lagring med de samme løsemidlene som i forrige eksperimentet. I tre serier med 4-8 paralleller i hver serie, ble membranen impregnert med diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbensen. Den ene serien ble umiddelbart, ved tiden 0, brukt til PALME ekstraksjon og analysert med CE. Den andre serien med impregnert membran ble benyttet i ekstraksjon 1 time etter lagring ved romtemperatur. Det ble også benyttet væskemembran 3 timer etter impregnering. Resultatet av ekstraksjonsutbyttene er oppført i tabell 11. Løsemidlene er rangert etter best utbytte ved de ulike tidspunktene.

Dodecylacetat viste seg å gi høyt utbytte både ved tidspunkt 0 og 1 time med RSD verdier under 10 %. Ekstraksjonsutbyttene ved tiden 0 og 1 time for dodecylacetat ble sammenlignet og funnet å være signifikant forskjellige. Gjennomsnittelig utbytte etter 3 timer var også med utbytter over 60, men RSD verdien økte. Fra det forrige eksperimentet ble det funnet ut at flyktigheten av dodecylacetat var ikke utsatt for fordampning selv etter 3 timer. Dette stemmer godt med de

utbytte verdiene fått i dette forsøket etter 3 timer med impregnering. Med hensyn til RSD verdiene kan det konkluderes at membranen bør anvendes kort tid etter impregnering, helst innen 1 time selv om flyktigheten til det organiske løsemiddelet er minst mulig. Fordampning av diheksyleter og isopentylbensen var derimot litt høyere enn dodecylacetat fra forrige eksperiment. I dette forsøket viste det seg at begge løsemidlene fungerte fortsatt etter oppbevaring i 1 time ved romtemperatur. Utbytte resultatene for isopentylbensen ble lavere etter 1 time med høye RSD verdier. Noe væskemembran var igjen etter 3 timer for isopentylbensen, men ikke nok til å gi utbytte. Diheksyleter derimot ga utbytte på 72 % etter 3 timer, men med høye RSD verdier. Dette skyldes at løsemidlene stort sett er fordampet bort etter å ha blitt oppbevart i lengre perioder enn 1 time. Diheksyleter har også en tendens til å svulle i polymeren og dermed påvirke analyseresultatene. Stabilitet av væskemembranen før ekstraksjonen er en viktig parameter for å få et robust ekstraksjonssystem. Opplysninger som dette kan være med på å gjøre valg av løsemidler til PALME mye enklere.

Tabell 11. Utbytte ved tiden 0,1 og 3 timer etter immobilisering

	Utbytte (%) <sup>3</sup> (n=8 <sup>1</sup> , n=4 <sup>2</sup> )			RSD <sup>4</sup> (%)
	0.time	1.time	3.timer	
Diheksyleter	82	77	72	10,7
Dodecylacetat	72	85	67	7,3
Isopentylbensen	73	41	0	8

<sup>1</sup> Diheksyleter og Dodecylacetat, <sup>2</sup> Isopentylbensen

<sup>3</sup> Gjennomsnittsutbytte av den upolare blandingen for de tre løsemidlene

<sup>4</sup> Gjennomsnitt av relativt standardavvik (RSD) av forsøkene med diheksyleter, dodecylacetat og isopentylbensen.

## 7.5 Påsetting av væskemembran

Fjerning av overskudd av organisk løsemiddel er vanlig ved bruk av denne metoden, og blir utført med bruk av medisinsk tørkepapir. Overskuddet blir fjernet få sekunder etter immobilisering med det organiske løsemiddelet. Dette er en enkel prosedyre også brukt i HF-LPME [17], men den er vanskelig å automatisere. I tillegg gir det dårlig kontroll på hvor mye organisk løsemiddel som blir tatt opp i membranen. Med tanke på framtidig automatisering av PALME ble det testet ut om tørking av overskuddet kunne påvirke utbytteresultatene. Utbyttene ble undersøkt med både immobilisering fra undersiden av filterplaten og fra oversiden av filterplaten. Med immobilisering fra undersiden ble overskuddet av organisk løsemiddel tørket med medisinsk tørkepapir. Ved immobilisering fra oversiden ble overskuddet ikke tørket bort da det ikke er mulig å nå ned til filteret (membranen) fra oversiden. Forsøket ble utført med diheksyleter. Resultatene er oppført i tabell 12.

Resultatene viste ingen signifikant forskjell i ekstraksjonsutbytter for fjerning og ikke fjerning av løsemiddelet fra membranen. RSD verdien var allikevel lavere når overskuddet ikke ble fjernet. De eksperimentelle dataene bekrefter dermed at å utelukke tørking av overskuddet ikke vil være kritisk for kvaliteten på de analytiske data. Ekstraksjonsutbytte påvirkes ikke i stor grad dersom overskuddet av løsemiddelet ikke fjernes, og for en framtidig automatisering av PALME vil det ikke være nødvendig å inkludere tørking av overskuddet som en ledd i prosedyren. Dette vil gjøre prosedyren lettere å utføre uten å by på et ekstra trinn, nemlig tørking av overskuddet med løsemiddel.

Tabell. 12 Utbytteresultatene med både fjerning og ikke fjerning av løsemiddelet i prosedyren

---

Utbytte (%) (n=8)		
	Fjerning <sup>1</sup> ( undersiden )	Ingen fjerning <sup>1</sup> (oversiden)
Diheksyleter	82	86
RSD (%) <sup>2</sup>	12	8

---

<sup>1</sup> Gjennomsnitt av utbytte resultatene for den upolare løsningen av analyttene

<sup>2</sup> Gjennomsnitt relativt standardavvik (RSD) av forsøkene

## 8. Konklusjon

Dette arbeidet har for første gang beskrevet ulike organiske løsemidlers evne til å ekstrahere basiske upolare og polare legemidler med den nye tilnærmingen til miniaturisert ekstraksjon, nemlig PALME. Prinsippet for ekstraksjon er den samme som i hulfiber basert LPME, men med mye enklere oppsett og utførelse i 96 brønns plater. Valg av riktig løsemiddel er vesentlig for god ekstraksjon og høye analyseresultater. Flere kriterier må vurderes deriblant løsemiddelets flyktighet i kontakt med luft. Lite fordampning av væskemembranen var målbart etter 1 time med eksponering i romtemperatur med høye utbytter. Dodecylacetat ble funnet å være mest stabil også 3 timer etter impregnering. Isopentylbensen og diheksyleter derimot ga høye RSD verdier etter 1 time i romtemperatur. Væskemembranen bør brukes kort tid (under 1 time) etter impregnering med det organiske løsemiddelet for sikre at resultatene blir pålitelig og nøyaktige. Løsemidler med kokepunkt over 220 °C er å anbefale på grunn av bedre stabilitet. Viskositet og vannløselighet er forøvrig like nødvendig å vurdere. I tillegg har dette arbeidet vist at valg av type løsemiddel bør være relatert til analyttens strukturelle egenskaper. For analytter med  $\log P$  høyere enn ca. 4 og  $\log P$  under 2 er valg av løsemiddel mer kritisk og krever løsemidler som gir bedre selektivitet av disse. Gruppe V (alkoholer) ga bedre utbytter av polare analytter, mens gruppe I (alifatiske etere og aminer), II (estere og ketoner) og IV (aromatisk etere, hydrokarboner og halogenerte forbindelser) av Kamlet og Taft klassifisering egnet seg for både polare og upolare analytter og bør vurderes for fremtidig implementering i PALME. I tillegg har dette arbeidet lansert noen nye løsemidler godt egnet som væskemembran i PALME blant annet 3-tolunitril, isopentylbensen som bør undersøkes nærmere.

Fjerning av overskudd av organisk løsemiddel har vist å ikke være nødvendig å utføre i prosessen noe som gjør det lettere å automatisere teknikken. Dessuten har det vist seg å gi lavere RSD verdier. Bedre ubytte resultater og den korte prøveopparbeidelsestiden sammenlignet med HF-LPME gjør PALME til en bedre ekstraksjonsteknikk. Det ønskes i svært nær fremtid at PALME kan utvikles til en full automatisert prøveopparbeidelse teknikk med kommersielt tilgjengelig utstyr innen legemiddelanalyse.

## 9. Referanseliste

1. Jeannot, M. A. and F. F. Cantwell (1996). "*Solvent microextraction into a single drop.*" Analytical chemistry 68(13): 2236-2240.
2. He, Y., et al. (1997). "*Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe.*" Analytical chemistry 69(22): 4634-4640
3. Jeannot, M. and F. Cantwell (1997). "*Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle.*" Analytical chemistry 69(2): 235-239.
4. Pedersen Bjergaard, S., et al. (2005). "*Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques.*" Journal of Chromatography. B 817(1): 3-12.
5. Rasmussen, K., et al. (2004). "*Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction.*" TrAC. Trends in analytical chemistry 23(1): 1-10.
6. Psillakis, E., et al. (2002). "*Developments in single-drop microextraction.*" TrAC. Trends in analytical chemistry 21(1): 54-64.
7. Rezaee, M., et al. (2010). "*Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method.*" Journal of chromatography A 1217(16): 2342-2357.
8. Pedersen Bjergaard, S., et al. (1999). "*Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis.*" Analytical chemistry 71(14): 2650-2656.
9. Gjelstad, A., et al. (2007). "*Microextraction across supported liquid membranes forced by pH gradients and electrical fields.*" Journal of Chromatography A 1157(1): 38-45.
10. Pedersen-Bjergaard, S. and K. E. Rasmussen (2006). "*Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: New concept for rapid sample preparation of biological fluids.*" Journal of chromatography A 1109(2): 183-190.

11. Gjelstad, A., et al. (2006). *"Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances"* Journal of chromatography A 1124(1): 29-34
12. MiddelthonBruer, T., et al. (2008). *"Parameters affecting electro membrane extraction of basic drugs."* Journal of separation science 31(4): 753-759.
13. Gjelstad, A., et al. (2011). *"Electromembrane extraction: a new technique for accelerating bioanalytical sample preparation."* Bioanalysis 3(7): 787-797.
14. Lars Erik Eng Eibak, *"Elektromembran ekstraksjon direkte fra biologiske matrikser"*, Universitet i Oslo (2010)
15. Gjelstad, A., et al. (2013). *"Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format."* Bioanalysis 5(11): 1377-1385.
16. Halvorsen, T., et al. (2003). *"Liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. Extraction from small volumes of biological samples."* Journal of separation science 26(17): 1520-1526.
17. Gjelstad, A. (2011). *"Hollow-Fibre Liquid-Phase Microextraction in the Three-Phase Mode-Practical Considerations."* LC GC Europe solutions for separation scientist 24(12): 633.
18. PedersenBjergaard, S., et al. (2002). *"Fundamental studies on selectivity in 3-phase liquid-phase microextraction (LPME) of basic drugs."* Journal of separation science 25(3): 141-146.
19. Pedersen Bjergaard, S., et al. (2008). *"Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction."* Journal of chromatography A 1184(1): 132-142.

20. Gjelstad, A., et al. (2012). *"Kinetic aspects of hollow fiber liquid-phase microextraction and electromembrane extraction."* *Analytica Chimica Acta* 742(0): 10-16.
21. Ho, T., et al. (2002). *"Liquid-phase microextraction of protein-bound drugs under non-equilibrium conditions."* *Analyst* 127(5): 608-613.
22. Ho, T., et al. (2002). *"Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction."* *Journal of chromatography A* 963(1): 3-17.
23. Psillakis, E., Kalogerakis, N.: *"Developments in liquid-phase microextraction"*. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 565-574)
24. Kevin D. Altria, *Capillary Electrophoresis Guidebook Principles, Operation, and Applications*, Totowa, N.J. : Humana Press, *Methods in molecular biology*; v. 52, 1996 s. 3-7
25. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K.E.: *Legemiddelanalyse, 2.utgave*, Fagbokforlaget Vigmostad & Bjørke AS, Bergen 2010, s. 58-61
26. Moore & McCabe & Craig: *Introduction to the Practice of Statistics, seventh edition*, W. H. Freeman and Company, USA 2012
27. de Juan, A., et al. (1997). *"Solvent classification based on solvatochromic parameters: a comparison with the Snyder approach."* *TrAC. Trends in analytical chemistry* 16(1): 52-62.
28. Seip, K., et al. (2014). *"Stability and efficiency of supported liquid membranes in electromembrane extraction—a link to solvent properties."* *Analytical and bioanalytical chemistry* 406(8): 2151-2161.
29. Pedersen-Bjergaard, S., et al., *Liquid-phase microextraction of basic drugs - Selection of extraction mode based on computer calculated solubility data.* *Journal of Separation Science*, 2005. 28(11): p. 1195-1203.

